

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin der Universität
Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Sensibilitätstestung antibiotischer Kombinationen
in vitro für gramnegative Erreger respiratorischer
Infektionen im Rahmen der Zystischen Fibrose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kressin, Simon Niklas**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Wolz
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Bohn

Tag der Disputation: 10.07.2025

Widmung

Für Mama, Papa und Jakob

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zystische Fibrose.....	1
1,2 Zystische Fibrose als Multisystemerkrankung.....	2
1.3 Infektionen des Respirationstraktes bei CF.....	3
1.4 Relevante Erreger chronischer Infektionen des Respirationstraktes bei CF.....	4
1.4.1 Pseudomonas aeruginosa.....	4
1.4.2 Achromobacter xylosoxidans.....	8
1.4.3 Burkholderia cepacia Komplex.....	10
1.5 Antibiotische Therapie im Rahmen von CF.....	13
1.5.1 Meropenem.....	14
1.5.2 Colistin.....	14
1.5.3 Tobramycin.....	15
1.5.4 Ceftazidim.....	15
1.5.6 Cotrimoxazol.....	15
1.5.7 Moxifloxacin.....	16
1.6 Antibiotische Kombinationstherapie und Synergie.....	17
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	18

2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
Laborgeräte.....	21
Labormaterialien.....	21
Nährmedien.....	22
Puffer und Reagenzien.....	22
Antibiotika.....	23
Bakterienspezies und -stämme.....	24
Systeme zur Resistenztestung.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Mikrobiologische/bakteriologische Methoden.....	25
2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen auf Agar.....	25
2.2.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen in Flüssigmedium.....	25
2.2.1.3 Sensibilitätstestung der Bakterienstämme.....	25
I Sensibilitätstestung mittels Vitek.....	25
II Sensibilitätstestung mittels Agardiffusion.....	26
III Sensibilitätstestung mittels Mikrobouillondilution.....	27
III.1 Sensibilitätstestung mittels MRGN Screening Platten.....	27
III.2 Individuelle Sensibilitätstestung mittels 96-Well Testplatten.....	27
2.2.2 Statistische Methoden sowie Auswertung synergistischer Effekte.....	32

3 Ergebnisse	33
3.1 Sensibilitätstestung mittels Mikrobouillondilution.....	34
3.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
I Testung der einzelnen Antibiotika.....	35
II Testung von Antibiotikakombinationen.....	38
II.1 Testung von Zweifachkombinationen.....	38
Kombination Tobramycin + Ceftazidim.....	41
Kombination Tobramycin + Colistin.....	44
II.2 Testung von Dreifachkombinationen.....	45
3.1.2 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	48
I Testung der einzelnen Antibiotika.....	48
II Testung von Antibiotikakombinationen.....	52
II.1 Testung von Zweifachkombinationen.....	52
Kombination Tobramycin + Ceftazidim.....	53
Kombination Tobramycin + Colistin.....	55
II.2 Testung von Dreifachkombinationen.....	57
3.1.3 <i>Burkholderia cepacia</i> Komplex (BCC).....	61
I Testung einzelner Antibiotika.....	61
II Testung von Antibiotikakombinationen.....	65
II.1 Testung antibiotischer Zweifachkombinationen.....	65
Kombination Tobramycin + Ceftazidim.....	67
Kombination Tobramycin + Colistin.....	71
Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin.....	72

II.2 Testung von Dreifachkombinationen.....	75
Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem.....	77
Dreifachkombination Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin.....	82
3.1.4 Zusammenfassung Fractional Inhibitory Concentration Index.....	85
4 Diskussion.....	87
4.1 Wahl der geeigneten Methodik.....	88
4.2 Vergleichbarkeit der bei Anwendung unterschiedlicher Verfahren zur Sensibilitätstestung.....	89
4.3 Fehlende Grenzwerte erschweren die Vorhersagbarkeit klinischer Effektivität..	90
4.4 Antibiotische Kombinationen bilden einen Grundpfeiler der CF-Therapie.....	92
4.5 Bewertung und mögliche Erklärung beobachteter Synergien.....	94
4.6 Problematik der Korrelation einer <i>in vitro</i> Wirksamkeit mit klinischer Effektivität und Patientenoutcome.....	98
5 Zusammenfassung.....	100
6 Literaturverzeichnis.....	102
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	111
8 Danksagung.....	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Biofilms im Rahmen der CF.....	7
Abbildung 2: Beispielhaftes Schema einer 96-Well Platte.....	28
Abbildung 3: Schema einer 96-Well Platte unterschiedlicher antibiotischer Zweifach- sowie Dreifachkombinationen.....	29
Abbildung 4: Exemplarische Wachstumsdarstellung des <i>P. aeruginosa</i> Isolates NF 21470 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration.	36
Abbildung 5: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber <i>P. aeruginosa</i> RP 73.....	41
Abbildung 6: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber <i>P. aeruginosa</i> NF 21470.....	42
Abbildung 7: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber <i>P. aeruginosa</i> NF 21470.....	44
Abbildung 8: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber <i>P. aeruginosa</i> NF 21470.....	47
Abbildung 9: Exemplarische Wachstumsdarstellung des <i>A. xylosoxidans</i> Isolates AC 27 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration	49
Abbildung 10: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 23.....	53
Abbildung 11: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 23.....	55
Abbildung 12: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 27.....	56
Abbildung 13: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 23.....	58

Abbildung 14: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 27.....	59
Abbildung 15: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber <i>A. xylosoxidans</i> AC 49.....	60
Abbildung 16: Exemplarische Wachstumsdarstellung des BCC-Isolates BC 3 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration	62
Abbildung 17: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 1.....	67
Abbildung 18: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 3.....	68
Abbildung 19: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 7.....	69
Abbildung 20: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 8.....	70
Abbildung 21: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber dem Isolat BC J2315.....	71
Abbildung 22: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat BC 1.....	72
Abbildung 23: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat BC 8.....	73
Abbildung 24: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat BC J2315.....	74
Abbildung 25: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat BC 1.....	77
Abbildung 26: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat BC 3.....	79

Abbildung 27: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber <i>dem</i> <i>Isolat</i> BC 8.....	80
Abbildung 28: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem <i>Isolat</i> BC J2315.....	81
Abbildung 29: Vergleich der Wirksamkeit von Moxifloxacin, Ceftazidim und Colistin einzeln mit der Kombination aus Meropenem + Ceftazidim + Colistin gegenüber dem <i>Isolat</i> BC1.....	82
Abbildung 30: Vergleich der Wirksamkeit von Moxifloxacin, Ceftazidim und Colistin einzeln mit der Kombination aus Meropenem + Ceftazidim + Colistin gegenüber dem <i>Isolat</i> BC 8.....	84
Abbildung 31: Darstellung der errechneten FICI-Werte sortiert nach Bakterienspezies sowie Antibiotikakombination.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	20
Tabelle 2: Labormaterialien.....	21
Tabelle 3: Nährmedien.....	22
Tabelle 4: Puffer und Reagenzien.....	22
Tabelle 5: Antibiotika.....	23
Tabelle 6: Bakterienspezies und -stämmen.....	24
Tabelle 7: Systeme zur Resistenztestung.....	24
Tabelle 8: Übersicht über die Grenzwerte der MHK für die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienspezies und Antibiotika.....	31
Tabelle 9: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme von <i>P. aeruginosa</i>	37
Tabelle 10: Darstellung der MHK in µg/ml auf Grundlage etablierter Routinemethoden zur Resistenztestung.....	38
Tabelle 11: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim und Tobramycin + Colistin.....	39
Tabelle 12: Darstellung der MHK der <i>P. aeruginosa</i> Patientenisolat NF21470 und NF2644 gegenüber der Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem....	46
Tabelle 13: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme von <i>A. xylosoxidans</i>	50
Tabelle 14: Darstellung der MHK in µg/ml auf Grundlage etablierter Routinemethoden zur Resistenztestung.....	51
Tabelle 15: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim sowie Tobramycin + Colistin.....	52
Tabelle 16: Darstellung der MHK der <i>A. xylosoxidans</i> Isolate.....	57
Tabelle 17: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme des BCC.....	63
Tabelle 18: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme des BCC.....	64

Tabelle 19: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin und Ceftazidim, Tobramycin und Colistin sowie Cotrimoxazol und Tobramycin.....	65
Tabelle 20: Darstellung der MHK für ausgewählte Isolate des BCC gegenüber den Dreifachkombinationen.....	76

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> Komplex
CF	Zystische Fibrose
CH	Schweiz
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COL	Colistin
CTZ	Ceftazidim
D	Deutschland
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ESBL	Extended-Spectrum-Betalactamase
E-Test	Epsilometer-Test
EUCAST	European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Frankreich
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
g	Gramm
h	Stunde
KBE	Koloniebildende Einheit
M	Mol
MEM	Meropenem
Mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MH-Medium	Mueller Hinton Medium
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRGN	Multiresistente Gramnegative Erreger

OD

Optische Dichte

PBP

Penicillin-bindendes-Protein

Tab

Tabelle

TOB

Tobramycin

UKT

Universitätsklinikum Tübingen

vgl.

Vergleiche

1 Einleitung

1.1 Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung und mit einer Inzidenz von etwa 1:5000 eine der am häufigsten diagnostizierten genetischen Erkrankungen in der kaukasischen Bevölkerung [3, 4]. Defekte im *Cystic Fibrosis Conductance Regulator* Gen (*CFTR*-Gen) führen zu Funktionsstörungen bzw. dem Fehlen dieses Chloridkanals in der Zellmembran und somit zu erhöhter Viskosität des Sekrets exokriner Drüsenzellen verschiedener Organe, die hierdurch fortschreitend geschädigt werden [5]. Die resultierenden klinischen Manifestationen sind je nach Mutationstyp und mitbeeinflussenden Faktoren vielfältig und von unterschiedlichem Schweregrad. So führt die häufigste Mutation F508del beispielsweise zu einem fehlerhaften Einbau der Kanalproteine in die Zelloberfläche, während dagegen andere Mutationsformen in einem völligen Fehlen, einer reduzierten Stabilität oder einer fehlerhaften Funktion des Kanalproteins resultieren [6]. Typische klinische Folgen umfassen neben einem hohen Chloridgehalt des Schweißes die häufig lebenslimitierenden rezidivierenden obstruktiven Bronchitiden sowie Manifestationen in Form progressiver exokrin pankreatischer Insuffizienz mit resultierender Malabsorption und Gedeihstörung, der Entwicklung hepatischer Funktionsstörungen sowie männliche Infertilität [7-10].

Heutzutage ist die Untersuchung auf CF Teil des regulären Neugeborenscreenings, was in der Regel zu einer frühen Diagnosestellung und besseren Therapieoptionen führt. Lange Zeit war die multidisziplinär konzipierte Therapie rein symptomatischer Natur, mittlerweile sind für einige Mutationstypen kausale Therapieansätze in Form von *CFTR*-Modulatoren verfügbar, die die verringerte Funktion der Chloridkanäle verbessern können [11]. Durch diese und durch weitere Fortschritte in den Therapiekonzepten [12] liegt heutzutage die Lebenserwartung eines Neugeborenen mit CF in Deutschland bei etwa 60

Jahren [13]. Nach wie vor handelt es sich bei der CF aber um eine im Verlauf tödliche Erkrankung [8] [7] [6].

1.2 Zystische Fibrose als Multisystemerkrankung

Die Konsequenzen der sehr variantenreichen Mutationen im *CFTR*-Gen sind vielfältig und betreffen unterschiedlichste Organsysteme, wodurch die CF eine Multisystemerkrankung darstellt.

Als wichtige Manifestation führt die Hyperviskosität des Pankreassekretes auf der einen Seite häufig zu einer frühzeitigen exokrinen Pankreasinsuffizienz und in der Folge zu Maldigestion und Fettstühlen. Auf der anderen Seite hat eine Verschlechterung des pankreatischen Sekretflusses häufig chronische Pankreatitiden zur Folge, die nicht selten zusätzlich in einer endokrinen Pankreasinsuffizienz münden. Im Verlauf entwickeln dadurch viele Patient*innen einen pankreopriven CF-Diabetes mellitus [14] [15].

In ähnlicher Weise sind Leber und Gallenwege von der Hyperviskosität ihrer Sekrete betroffen. Typische Folgen sind Cholestase, Cholezystolithiasis und eine Leberverfettung, die bis hin zur Ausbildung einer Leberzirrhose und portalen Hypertension reichen kann [14, 16, 17].

Als weitere Ausprägung sind über 95% der männlichen CF-Patienten aufgrund obstruktiver Azoospermie von Infertilität betroffen [18].

Neben diesen vielen Komorbiditäten bleibt die respiratorische Symptomatik in aller Regel jedoch der die Prognose limitierende Faktor. Aufgrund der erhöhten Viskosität des Mukus ist die mukoziliäre Clearance der Lunge vermindert, wodurch Sekret und Pathogene nicht in ausreichendem Maße abtransportiert werden können. Es kommt zu rezidivierenden bronchopulmonalen Entzündungen und zu einer chronischen Inflammation. Dies führt mit der Zeit zur Schädigung der Atemwege sowie des umgebenden Lungenparenchyms und in Folge zur Ausbildung von Bronchiektasen und Lungenemphysemen [19].

1.3. Infektionen des Respirationstraktes bei CF

In Assoziation mit der chronischen Inflammation steht in der Regel der Nachweis einer komplexen polymikrobiellen Besiedlung in den respiratorischen Sekreten der Patient*innen mit CF [20, 21]. Die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Bakterienspezies, Viren und auch Pilzen variiert dabei stark innerhalb des Patientenkollektivs und ihre jeweilige Bedeutung für Entstehung und Progression chronisch entzündlicher Prozesse ist häufig noch nicht vollständig verstanden [20, 22]. Zudem zeigen sich altersabhängige Charakteristika in der Zusammensetzung der bakteriellen Besiedlung. Im Kindesalter können so beispielsweise häufig Erreger wie *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Alter steigt dann der Anteil der Keime, deren Nachweis häufiger mit chronischen Infektionen assoziiert ist und vielfach einen rapiden Abfall der Lungenfunktion zur Folge hat [19]. Wichtige Vertreter sind in diesem Kontext *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und Vertreter des *Burkholderia cepacia* Komplexes (*BCC*) [23]. Hinzu kommen häufig Besiedlungen mit Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* und *Candida species* oder der Nachweis nicht-tuberkulöser Mykobakterien [24, 25].

In diesem Kontext hat sich eine aggressive antibiotische Therapie der chronischen respiratorischen Infektionen als essentiell erwiesen, da diese mit beschleunigter Destruktion von Lungengewebe sowie deutlichem Abfall der Lungenfunktion assoziiert sind [26].

Erhöhte Viskosität des Mukus sowie eine dadurch verminderte mukoziliäre Clearance ermöglichen zudem die Ausbildung eines Mikromilieus, das chronische bakterielle Besiedlung und Infektion begünstigt und gleichzeitig die Therapie erschwert [19, 27]. Eine wichtige Rolle spielt die begünstigte Ausbildung bakterieller Biofilme, die die Wirksamkeit vieler Antibiotika verändern und zudem eine verlässliche Vorhersage hinsichtlich einer geeigneten antibiotischen Therapie und ihrer Dosierung erschweren [27, 28]. Häufig gelingt es im Verlauf nicht mehr, die Erreger chronischer respiratorischer Infektionen vollständig zu eradizieren [29].

Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit 3 Spezies, die häufig in den Lungen von CF-Patient*innen zu finden sind und mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion, erhöhter Zahl pulmonaler Exazerbationen sowie einem Anstieg von Morbidität und Mortalität einhergehen. Zudem zeigen sie sich aufgrund einer großen Bandbreite intrinsischer sowie erworbener Resistenzmechanismen in der antibiotischen Therapie häufig schwierig zu behandeln [29].

1.4 Relevante Erreger chronischer Infektionen des Respirationstraktes bei CF

1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Ein besonders wichtiger Erreger dieser Gruppe ist *Pseudomonas aeruginosa*. Dabei handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes, begeißeltes und gramnegatives Bakterium mit vorwiegend aerobem Wachstum. Typischerweise spielt dieser opportunistische Keim eine wichtige Rolle bei nosokomialen Infektionen wie Pneumonien beatmeter Patient*innen, Harnwegsinfektionen sowie Infektionen im Rahmen einer Immundefizienz mit hohem Risiko lebensbedrohlicher Verläufe [30, 31].

Des Weiteren ist *P. aeruginosa* gefürchtet aufgrund häufig langwieriger und komplikationsreicher Wundinfektionen, beispielsweise im Rahmen eines diabetischen Fußsyndroms oder von Brandwunden [30, 32]. Auch ist *P. aeruginosa* ein häufiger Auslöser des sogenannten „swimmer’s ear“, einer akuten Otitis externa [33].

Besondere Bedeutung kommt *P. aeruginosa* durch seine Rolle als führender und gefürchteter Erreger chronisch pulmonaler Infektionen im Rahmen einer CF-Grunderkrankung zu, die zu erhöhter Morbidität und Mortalität führen. Die Prävalenz von Infektionen mit *P. aeruginosa* ist dabei mit steigendem Lebensalter zunehmend. Sind im Kindesalter nur etwa 10 – 30% betroffen, kann bereits im jungen Erwachsenenalter bei etwa 80 % der CF-Patient*innen eine Infektion mit *P. aeruginosa* nachgewiesen werden [29, 34, 35]. Ein entscheidender Grund hierfür ist eine Vielzahl intrinsischer sowie erworbener

Einleitung

Resistenzmechanismen des Keimes gegenüber vielen gängigen Antibiotika, die eine vollständige Eradikation erschweren und oftmals komplett verhindern.

P. aeruginosa zeichnet sich im Besonderen durch hohe Anpassungsfähigkeit und metabolische Flexibilität aus. Hinzu kommt eine Vielzahl unterschiedlicher Virulenzfaktoren, die zusammen mit zahlreichen Regulationsmechanismen zu chronischer Besiedlung und flexibler Adaptation befähigen [36].

Einen wichtigen Beitrag leistet in diesem Zusammenhang bereits die komplex aufgebaute Zellmembran aus einer äußeren Schicht, hauptsächlich bestehend aus Lipopolysacchariden, und einer inneren Schicht, vorwiegend zusammengesetzt aus unterschiedlichen Phospholipiden [37, 38]. Neben ihrer Barrierefunktion ist sie beteiligt an zahlreichen Prozessen wie der Induktion inflammatorischer Prozesse oder der Interaktion mit körpereigenen Rezeptoren und spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Biofilmen [39]. Zudem trägt sie durch Einbau unterschiedlicher Membranproteine wie Porine oder Effluxpumpen maßgeblich zur Ausbildung antibiotischer Resistenzen bei [38, 40].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von *P. aeruginosa* ist seine gute Beweglichkeit. Die Ausbildung eines Flagellums sowie beweglicher Pili ermöglicht erst die chemotaktisch gesteuerte Bindung an Zellen des respiratorischen Epithels sowie die Ausbildung stabiler Biofilme [41-43].

Entscheidend zur hohen Pathogenität tragen darüber hinaus Systeme zur Sekretion unterschiedlicher Proteine bei. Auf diesem Weg können beispielsweise Proteasen, Lipasen und Exotoxine wirksam werden, die zu lokaler Destruktion und Inflammation führen sowie zur kompetitiven Zerstörung der bakteriellen Flora der Lunge [44]. Andere Sekretionssysteme führen dagegen direkt zu einer Schwächung oder Inaktivierung des Immunsystems und der lokalen Abwehrreaktion des Wirtes [45] [46].

Darüber hinaus ist *P. aeruginosa* in der Lage, die Aufnahme elementarer Nährstoffe wie Eisen beispielsweise mittels unterschiedlicher Siderophore flexibel an die jeweils aktuelle Stoffwechsellage und Umgebung anzupassen [38, 47]

Einleitung

Ein wichtiger weiterer Faktor für die hohe Anpassungsfähigkeit ist die beachtliche Größe des Genoms sowie eine ganze Reihe regulatorischer Mechanismen auf genetischer Ebene. Dies befähigt *P. aeruginosa*, sich fortwährend an die Umgebung neu anzupassen und im Verlauf eigene Charakteristika grundlegend zu ändern [38, 48, 49]. Wichtig in diesem Kontext ist das sogenannte „Quorum sensing“, das flexible Anpassung sowie genetische Regulation auf Grundlage von Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht [50].

***P. aeruginosa* im Rahmen der CF**

Die Lungen von CF-Patient*innen stellen eine herausfordernde Umgebung dar, die sich im Verlauf einer chronischen Besiedlung immer wieder ändert. In diesem Kontext kommt *P. aeruginosa* seine Fähigkeit zur flexiblen Adaptation zu Gute. So durchlaufen die Stämme im Laufe der Zeit eine ganze Reihe entscheidender phänotypischer und genetischer Anpassungen, die eine dauerhafte Kolonisation erst ermöglichen [51]. Fortwährender Selektionsdruck durch anhaltende antimikrobielle Behandlung sowie das Immunsystem der Patient*innen führen dazu, dass sich Stämme mit deutlich erhöhter Mutationsfähigkeit durchsetzen und mit zunehmender Besiedlungsdauer einen immer größeren Anteil an der bakteriellen Flora der betroffenen Lungen ausmachen, wodurch die Zahl unterschiedlicher Subpopulationen steigt [38, 52, 53].

Ein wichtiges Merkmal für Chronifizierung ist der Übergang zu mukoidem Wachstum in Kolonien, die sich durch langsames Wachstum auszeichnen sowie einer hohen Tendenz zur Ausbildung von Biofilmen [38, 54]. Bei Biofilmen handelt es sich um einen hochkomplexen Zusammenschluss aus Bakterien, unterschiedlichen Exopolysacchariden (EPS), extrazellulärer DNA sowie verschiedenen Proteinen [55, 56]. Sie weisen komplexe Systeme der Kommunikation und Nährstoffversorgung auf und zeigen eine hohe Toleranz gegenüber Antibiotika, der Immunantwort des Körpers sowie einem Mangel an Nährstoffen oder Sauerstoff [38, 56]. Weitere Anpassung umfasst die Ausbildung sogenannter *persistenter Zellen*, die sich durch ausgesprochen niedrige Stoffwechselaktivität auszeichnen, für lange Zeit hohe Dosen von Antibiotika

Einleitung

tolerieren, dem Immunsystem kaum Angriffspunkte bieten und anschließend als Ausgangspunkt einer neuen Besiedlung mit *P. aeruginosa* dienen können [57, 58]. Diese phänotypischen Anpassungen sorgen unter anderem für eine verringerte Effektivität der Immunreaktion des Körpers sowie erhöhter Resistenz gegenüber antibiotischer Therapie.

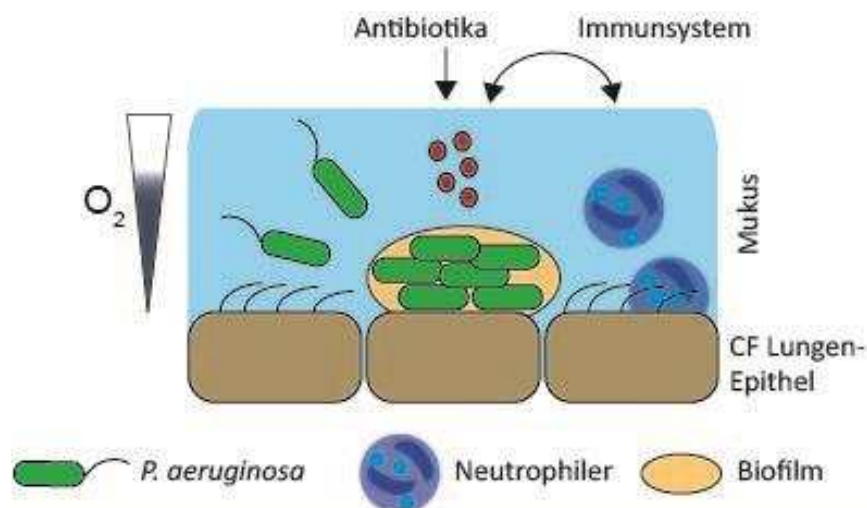


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines bakteriellen Biofilms im Rahmen der CF

Abb. 1 zeigt schematisch einige Charakteristika bakterieller Biofilme am Beispiel von *P. aeruginosa*. Als komplexe Gemeinschaften häufig unterschiedlicher Mikroorganismen zeigt sich in Biofilmen bei hoher Anpassungsfähigkeit eine breite phänotypische Heterogenität der Bakterien [1]. Veränderungen der bakteriellen Stoffwechselaktivität, wie die Ausbildung der *persister cells*, die Produktion einer hochkomplexen Extrazellulärmatrix sowie ausgeprägte regionale Unterschiede innerhalb eines Biofilms hinsichtlich des Angebotes an Nährstoffen und Sauerstoff bestimmen dieses Mikromilieu [1]. Die Folgen sind Änderungen und häufig die Abnahme der Wirksamkeit von Immunantwort und antibiotischer Effektivität [2].

Bereits intrinsisch zeigt sich *P. aeruginosa* resistent gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika. Dazu gehören Vertreter der Antibiotikaklassen der Flouorchinolone, Aminoglykoside und β -Laktam-Antibiotika [59]. Wichtige Gründe für die Resistenz sind die geringe Permeabilität der äußeren Zellmembran oder die Ausbildung verschiedener Efflux-Pumpen und Porine [59, 60]. Durch diese werden Antibiotika direkt wieder aus dem Zellinneren hinausbefördert oder aber beispielsweise durch β -Lactamasen im Zellinneren abgebaut.

Einleitung

Im Verlauf führt erhöhter Selektionsdruck zu weiterer Adaption, beispielsweise durch intensive antibiotische Therapie. Bereits bestehende Mechanismen werden noch weiter verstärkt und zusätzlich die Angriffspunkte für Antibiotika auf genetischer Ebene durch Mutationen und Regulationsprozesse soweit geändert, dass diese unter Umständen ihre Wirksamkeit verlieren [49, 52]. Dies sind Gründe dafür, dass eine vollständige Eradikation von *P. aeruginosa* sehr häufig im Verlauf chronischer Infektionen aufgrund von Multiresistenz kaum mehr möglich ist [38].

1.4.2 *Achromobacter xylosoxidans*

Eine weitere Erregerspezies, die immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit rückt, ist *Achromobacter*. Dabei handelt es sich ebenfalls um weit verbreitete, gramnegative, bewegliche, Katalase- und Oxidase-positive Bakterien [61]. Sie wachsen hauptsächlich unter aeroben Bedingungen, wobei auch zusätzliches anaerobes Vorkommen diskutiert wird [62]. Häufig sind diese Erreger wie auch Pseudomonaden in feuchter Umgebung anzutreffen [29, 63]. Unter den bereits identifizierten 21 Unterarten spielt besonders *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*) eine entscheidende Rolle. Daher fokussiert sich diese Arbeit auch auf diese.

Neben der Bedeutung im Rahmen nosokomialer Infektionen wie Pneumonien, Peritonitiden oder Harnwegsinfektionen steht besonders die steigende Inzidenz chronischer Lungenbesiedlung im Rahmen einer CF-Erkrankung im Fokus [64]. Allerdings ist die Bedeutung einer chronischen Kolonisation mit *A. xylosoxidans* noch nicht abschließend geklärt. Fraglich ist, in welchem Maße *A. xylosoxidans* selbst Destruktion von Lungenparenchym, Zunahme pulmonaler Exazerbationen und in Folge eine Abnahme der Lungenfunktion bewirkt. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass unter chronischer Besiedlung mit *A. xylosoxidans* ähnliche Entzündungslevel erreicht werden können, wie beispielweise durch *P. aeruginosa* [63] sowie die Wahrscheinlichkeit pulmonaler Exazerbationen zunimmt [65]. Allgemein gilt der Nachweis einer chronischen Besiedlung mit *A. xylosoxidans* als Ausdruck einer fortgeschrittenen CF-assoziierten

Einleitung

Lungenerkrankung. Daher wird bei Detektion einer pulmonalen Besiedlung eine möglichst vollständige Eradikation des Erregers empfohlen. Diese gestaltet sich aufgrund der intrinsischen Besonderheiten häufig schwierig und hinsichtlich Therapieregime, -dauer und -dosierung gibt es bisher keine einheitliche Empfehlung. [66]

A. xylosoxidans besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die vergleichbar sind mit denen von *P. aeruginosa* und es ihm ermöglichen, dauerhaft die Lungen von CF-Patient*innen zu besiedeln.

Eines der wichtigen Merkmale von *A. xylosoxidans*, durch die es ihm gelingt, sich schnell und variabel an unterschiedliche Umgebungen und Voraussetzungen anzupassen, wird als Fähigkeit zur „Hypermuation“ beschrieben. Der Grund hierfür sind Defizite in genetischen Reparaturmechanismen, die zu höheren Mutationsraten führen. Dies ermöglicht eine schnellere und flexiblere Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen [64, 67, 68]. In Studien konnte in 44 % der *A. xylosoxidans*-Isolate von CF-Patient*innen die Fähigkeit zur Hypermuation nachgewiesen werden, die sich ausschließlich im Rahmen chronischer Infektionen zeigte [64].

Darüber hinaus besitzt *A. xylosoxidans* etliche zelluläre Systeme zur Sekretion von Proteinen, wie sie auch beispielsweise in *P. aeruginosa* beschrieben wurden. Diese tragen maßgeblich zu Virulenz und gleichzeitig zur Inhibierung körpereigener Abwehrmechanismen bei. So führt beispielsweise eine durch unterschiedliche Toxine vermittelte Zytotoxizität zur Lyse von Wirtszellen wie auch von Makrophagen und anderen Bestandteilen der zellulären Immunabwehr [68-70].

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die *A. xylosoxidans* mit *P. aeruginosa* teilt, ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, die in nahezu 100% der *A. xylosoxidans* Isolate beobachtet werden kann [68, 71, 72]. Sie sind in der Lage, Flagellen wie auch Fimbrien zu bilden, die erst die nötige Motilität zur Synthese eines Biofilms gewährleisten und die Adhäsion an Epithelzellen im Verlauf ermöglichen. Durch Sekretion und Einbettung in eine selbstproduzierte Extrazellulärmatrix gelingt *A. xylosoxidans* häufig eine persistente

Einleitung

Kolonialisierung der betroffenen Lungen mit Entwicklung einer hohen Toleranz gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Mechanismen und vielen gängigen Antibiotika [68, 73].

Zusätzlich weist *A. xylosoxidans* unterschiedliche intrinsische Resistenzmechanismen auf und ist in der Lage, Antibiotika beispielsweise enzymatisch abzubauen oder mittels Effluxpumpen wieder aus dem Zellinneren heraus zu befördern [74]. So sind Isolate durch die Produktion von β -Lactamasen in der Regel resistent gegenüber nahezu allen Vertretern der Cephalosporine, ausgenommen Ceftazidim, sowie gegenüber Aminoglykosiden und Aztreonam. Daher ist eine vollständige Eradikation häufig schwierig. Aus den wenigen verbleibenden antibiotischen Therapieoptionen werden daher häufig Cotrimoxazol, Ceftazidim, Meropenem oder Piperacillin/Tazobactam gewählt [68, 75].

Aufgrund verschiedener Anpassungsmechanismen, die in ihrer Ausprägung häufig mit denen von *P. aeruginosa* vergleichbar sind, ist *A. xylosoxidans* daher bestens an eine chronische Besiedlung der Lungen von CF-Patient*innen angepasst und in der Lage, auch unter sich immer wieder ändernden Bedingungen fortzubestehen.

1.4.3 *Burkholderia cepacia* Komplex

Der *Burkholderia cepacia* Komplex (BCC) umfasst eine Gruppe von mindestens 20 gramnegativen, aeroben, Katalase- und Oxidase-positiven Bakterienspezies, die eine hohe phäno- und genotypische Ähnlichkeit zueinander aufweisen [29, 76]. Die Spezies des BCC sind wie Pseudomonaden weit verbreitete Umweltkeime [29, 76]. Außerhalb respiratorischer Infektionen im Rahmen der Mukoviszidose sind Vertreter des BCC unter anderem durch regelmäßige Kontamination von Infusionen, Desinfektionsmitteln und anderer Medizinprodukte gefürchtet sowie bei nosokomialen Infektionen immunsupprimierter Patient*innen [29, 77]. Im Rahmen einer CF-Grunderkrankung sind sie in besonderem Maße schwierig zu eradizieren und in der Regel mit einer deutlichen Abnahme der Lungenfunktion im Verlauf

Einleitung

assoziiert. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass sie ebenso wie *P. aeruginosa* und *A. xylosoxidans* eine ganze Reihe von Anpassungsmöglichkeiten und Resistenzmechanismen aufweisen, die auf der einen Seite ein Überleben in sich schnell ändernden Bedingungen ermöglichen und auf der anderen Seite häufig eine wirkungsvolle Bekämpfung verhindern. Zudem sind sie dazu in der Lage, sich leicht durch direkte Übertragung zwischen CF- Patienten*innen zu verbreiten, wodurch einzelne *BCC* Spezies bereits zu regelrechten Epidemien innerhalb dieses Patientenkollektivs geführt haben [78-80].

Aus dieser Gruppe des *BCC* hervorzuheben sind die beiden Spezies *B. cenocepacia* sowie *B. multivorans*. Sie sind diejenigen, die für den überwiegenden Teil der relevanten Infektionen im Rahmen einer CF- Grunderkrankung verantwortlich sind. Vor allem *B. cenocepacia* ist aufgrund schwerer pulmonaler Infektionen gefürchtet und geht nicht zuletzt mit einem besonders hohen Risiko der Entwicklung des *Cepacia Syndroms* einher [78]. Dabei handelt es sich um eine akut nekrotisierende Pneumonie, die mit einer sehr hohen Mortalität von etwa 50 Prozent assoziiert ist und zum überwiegenden Teil von *B. cenocepacia* verursacht wird [81]. Diese Arbeit fokussiert sich daher auf diese beiden und besonders die letztgenannte Spezies des *BCC*.

Für die hohe Virulenz insbesondere von *B. cenocepacia* und dessen ausgezeichnete Anpassung an das Milieu in den Lungen von CF-Patient*innen gibt es verschiedene Gründe. Eine wichtige Rolle spielen dabei unterschiedliche Anpassungsmechanismen auf genetischer Ebene, von denen hier einige dargestellt werden sollen.

Eine entscheidende Rolle für die hohe Fähigkeit zur Adaptation spielt eine ausgeprägte genetische Variabilität. So führt beispielsweise oxidativer Stress in einigen Spezies zu einem genetischen Rearrangement [78, 82]. Eine weitere Rolle in der Adaptivität spielt das sogenannte *Quorum sensing*, welches Bakterien wie *B. cenocepacia* durch Zell-Zell-Kommunikation eine Regulation ihrer Genexpressivität ermöglicht [78, 83].

Einleitung

Eine Anpassung, die besonders für das Überleben in den Lungen von CF-Patient*innen entscheidend ist, stellt die Fähigkeit von *B. cenocepacia* dar, die Aufnahme von Eisen auf genetischer Ebene hoch zu regulieren. Dies ist einer von vielen Gründen, warum diese Spezies besonders gut in dem eisendefizienten Sputum im Rahmen einer CF-Erkrankung überleben kann [84].

Ein großes Problem, besonders in der Therapie von *B. cenocepacia*, stellen Resistenzen gegen eine ganze Reihe von Antibiotikaklassen dar. Intrinsische Resistenzen betreffen dabei beispielsweise Cephalosporine, Aminoglykoside sowie Penicilline [85, 86]. Hinzu kommt die Fähigkeit, im Verlauf gegen nahezu alle anderen Klassen von Antibiotika Resistenzen entwickeln zu können.

Befähigt wird *B. cenocepacia* hierzu unter anderem durch Mechanismen wie dem enzymatischen Abbau oder der Inaktivierung unterschiedlicher Antibiotika, beispielsweise von Vertretern der Cephalosporine durch β -Lactamasen [87]. Eine weitere entscheidende Rolle spielen eine häufige Veränderung und Anpassung der Angriffspunkte für Antibiotika sowie die Ausbildung verschiedener Klassen von Effluxpumpen [78, 88].

Gute Beweglichkeit stellt darüber hinaus eine weitere wichtige Eigenschaft von *B. cenocepacia* dar, möglich durch die Ausbildung eines Flagellums, das darüber hinaus auch in der Funktion eines Adhäsins das Bakterium zur Invasion von Wirtszellen befähigt [89].

Zudem trägt die Produktion von Phospholipasen sowie verschiedener Zink Metalloproteasen zur hohen Pathogenität von *B. cenocepacia* bei, da sie beispielsweise die Spaltung von Kollagenfibrillen im umliegenden Gewebe ermöglichen [88, 90].

1.5 Antibiotische Therapie im Rahmen von CF

Im Rahmen einer CF-Erkrankung stellen nach wie vor pulmonale Infektionen den wichtigsten Grund für Morbidität sowie Mortalität dar. Erhöhte Viskosität des Bronchialsekrets sowie eine erschwerte und dadurch reduzierte mukoziliäre Clearance bilden den perfekten Nährboden für eine chronische Besiedlung mit Bakterien. Dieser Teufelskreis aus chronischer Obstruktion, rekurrenter bakterieller Besiedlung und Infektion mit daraus resultierender Inflammation führt in der Regel im Verlauf zu kontinuierlicher Abnahme der Lungenfunktion sowie letztendlich respiratorischem Versagen [91-93]. Umso wichtiger ist eine konsequente und frühzeitige Detektion und Eradikation von Besiedlung und Infektion. Besonders die Eradikation gestaltet sich leider in vielen Fällen sehr schwierig. Ein Grund sind die bereits beschriebenen Eigenschaften typischer Erreger wie Pseudomonaden, Vertretern von *A. xylosoxidans* oder des BCC mit ausgeprägten Resistenzmechanismen und einer hohen Adaptivität an das gegebene Mikromilieu mit häufiger Ausbildung von Biofilmen. Zudem ist es schwierig, die tatsächliche Effektivität und Wirkung der Antibiotika gegenüber den Bakterien abzuschätzen. Gründe hierfür sind unter anderem die schlechte Übertragbarkeit von Ergebnissen der routinemäßigen *in vitro* Empfindlichkeitstestung auf die tatsächlichen Verhältnisse in den Lungen von CF-Patient*innen, eine in diesem Milieu unter Umständen geänderte Pharmakokinetik sowie die Schwierigkeit einer ausreichenden lokalen Penetration des Lungengewebes [94, 95]. Wie bereits dargestellt, spielt die Ausbildung von Biofilmen eine entscheidende Rolle [96]. Bestehend aus einer makromolekularen Extrazellulärmatrix bieten sie den Mikroorganismen sowohl einen verbesserten Schutz gegenüber dem Immunsystem des Wirtes als auch gegenüber vielen Antibiotika und ermöglichen eventuell überhaupt erst das Wachstum in dem herausfordernden Mikromilieu der Lungen von CF-Patient*innen mit reduziertem Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen [52, 97].

Die Folge einer unzureichenden und erfolglosen Eradikationstherapie ist leider häufig eine weitere Zunahme bakterieller Resistenzen, was eine erfolgreiche Eradikation im Verlauf immer unwahrscheinlicher macht [29, 91, 98].

Einleitung

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika hinsichtlich ihrer Charakteristika sowie ihrer Rolle in der Behandlung respiratorischer Infektionen im Rahmen einer CF-Grunderkrankung genauer dargestellt.

1.5.1 Meropenem

Meropenem ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Carbapeneme und Vertreter der β -Lactam-Antibiotika. Durch Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese wirkt es gegen ein breites Spektrum sowohl gramnegativer, grampositiver als auch anaerober Erreger. Zudem ist es gegenüber den meisten bakteriellen β -Lactamasen unempfindlich und zeichnet sich durch gute Penetration zahlreicher Gewebe aus [99].

Dank seines breiten Wirkspektrums sowie seiner guten Wirksamkeit gegenüber vielen Vertretern der Gruppen 3-MRGN, beispielsweise ESBL-bildenden Keimen, wird es in der Therapie schwerer, auch nosokomialer Infektionen diverser Organsysteme eingesetzt. So findet Meropenem beispielsweise Anwendung in der Therapie von Infektionen der oberen und unteren Atemwege, der Niere und Harnwege, des Magen-Darm-Traktes oder auch im Rahmen einer Sepsis [100].

Aufgrund seiner guten Aktivität gegenüber *Pseudomonaden* sowie Vertretern des BCC wird Meropenem im Rahmen einer CF besonders zur Therapie der letztgenannten Spezies regelmäßig eingesetzt [29, 101].

1.5.2 Colistin

Colistin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Polymyxine. Durch Zerstörung der bakteriellen Zellmembran wirkt es besonders gegen aerobe gramnegative Erreger und wird beispielsweise als Reserveantibiotikum bei Infektionen mit multiresistenten Keimen wie Carbapenem-resistenten *Pseudomonaden* oder *Enterobacteriaceae* eingesetzt [102, 103]. Bei intravenöser oder oraler Anwendung zeigt Colistin besonders Nephro- und Neurotoxizität, seit 2012 ist es auch inhalativ verfügbar. Dies bringt bei Infektionen der Atemwege den großen Vorteil mit sich, dass hierdurch deutlich höhere Konzentrationen am Ort der

Einleitung

Infektion erreicht werden können bei gleichzeitig verringerter systemischer Toxizität [104, 105]. Daher hat sich gerade in der Therapie pulmonaler Infektionen im Rahmen einer CF-Grunderkrankung der inhalative Einsatz von Colistin beispielsweise bei chronischer Infektion oder Besiedlung mit *P. aeruginosa* etabliert [104]. Dagegen weisen andere Keime wie zum Beispiel der *BCC* intrinsische Resistenzen gegenüber Colistin auf [106].

1.5.3 Tobramycin

Bei Tobramycin handelt es sich um ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside. Es hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese durch Wechselwirkung mit der ribosomalen 30S Untereinheit. Ebenso wie Colistin ist auch Tobramycin in inhalativer Form seit 1998 zugelassen [104]. Dadurch zeigt es sich auch über eine längere Therapiedauer in der Regel gut tolerabel, beispielsweise in der Langzeittherapie chronisch respiratorischer Infektionen mit *P. aeruginosa* im Rahmen von CF [107] unter teils über lange Zeit kontinuierlicher Antibiotikagabe in inhalativer Form [108, 109].

1.5.4 Ceftazidim

Bei Ceftazidim handelt es sich um ein Cephalosporin der 3. Generation, genauer der Klasse 3b. Durch Inhibition der Zellwandsynthese wirkt es bakterizid. Es zeigt besonders gute Wirkung im gramnegativen Bereich und in der Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* [110]. Um enzymatischen Abbau zu verhindern, beispielsweise durch ESBLs im Rahmen der Therapie einer Infektion mit *P. aeruginosa*, kann Ceftazidim mit dem β -Lactamase-Inhibitor Avibactam kombiniert werden [111, 112].

1.5.5 Cotrimoxazol

Ein weiteres in der Therapie im Rahmen der CF verwendetes Antibiotikum ist Cotrimoxazol. Dabei handelt es sich um eine feste Kombination aus Trimethoprim sowie Sulfamethoxazol. Die antibakterielle Wirkung beruht auf

Einleitung

Interferenz mit der bakteriellen Synthese von Tetrahydrofolsäure, einem essenziellen Baustein beispielsweise für die Bildung von Purinen im Rahmen der DNA-Synthese. Dadurch wirken beide Kombinationspartner primär bakteriostatisch und zeigen in Kombination bakterizide Wirkung gegenüber einem breiten Spektrum an Erregern, im sowohl gramnegativen als auch grampositiven Bereich.

CF - spezifisch zeigt Cotrimoxazol zum Beispiel gegenüber Vertretern von *A. xylosoxidans* in der Regel gute Aktivität [113]. Des Weiteren findet Cotrimoxazol Anwendung in der Therapie von Infektionen mit Vertretern des BCC, auch im Rahmen des gefürchteten *Cepacia Syndroms* [81].

1.5.6 Moxifloxacin

Moxifloxacin ist ein Vertreter aus der Gruppe der Flouorchinolone. Über die Hemmung der an der DNA-Synthese beteiligten bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase) wirkt diese Antibiotikaklasse bakterizid. In dieser Gruppe gehört Moxifloxacin zur vierten Generation der Flouorchinolone und zeichnet sich durch besonders gute Wirksamkeit im grampositiven Bereich sowie gegenüber Vertretern der Anaerobier aus. Maßgeblich für die Wirksamkeit sind unter anderem eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit sowie Gewebepenetration [114].

Während Moxifloxacin keine Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa* zeigt [114], konnte in Kombination mit anderen Antibiotika, beispielsweise mit Ceftazidim und Colistin, ein guter Effekt gegenüber Vertretern des BCC nachgewiesen werden [115] und wird daher auch in dieser Arbeit untersucht.

1.6 Antibiotische Kombinationstherapie und Synergie

In der Therapie respiratorischer Infektionen im Rahmen einer CF- Grunderkrankung kommt eine ganze Reihe verschiedener Antibiotika zum Einsatz, wobei insbesondere für unterschiedliche Kombinationstherapien, die häufig im Rahmen einer CF eingesetzt werden, ein Mangel an Evidenz aus größer angelegten klinischen Studien herrscht [116, 117].

Die Kombination mehrerer Vertreter unterschiedlicher Antibiotikaklassen ist nicht nur im Rahmen der CF gängig. So erhofft man sich beispielsweise einen verbesserten Effekt intrazellulär wirksamer Antibiotika durch die Kombination mit einem Partner, der die Synthese der bakteriellen Zellwand inhibiert. Vor diesem Hintergrund findet zum Beispiel die Kombination aus Gentamicin und Ampicillin unter anderem in der Therapie der neonatalen Sepsis oder einer Listeriose Anwendung [118, 119].

Die Verwendung von Kombinationen unterschiedlicher Antibiotika zielt unter anderem auf eine Verbreiterung des antimikrobiellen Wirkspektrums ab sowie auf eine Reduktion bakterieller Resistenzen im Vergleich zur Monotherapie [116]. Auch zeigen eine Reihe an Kombinationspartnern untereinander synergistische Wirkungen, wodurch die Dosis des einzelnen Antibiotikums reduziert werden kann. Zusätzlich sinkt dadurch das Risiko einer Resistenzentwicklung gegenüber über längerer Zeit eingesetzten Antibiotika [120]. Auf der anderen Seite steigt mit zunehmender Zahl an Antibiotika die Gefahr erhöhter Toxizität, ebenso wie die Komplexität der Behandlung sowie die Gefahr sekundärer bakterieller Begleitinfektionen [120].

Um den klinischen Nutzen einer antibiotischen Kombinationstherapie im Rahmen der CF besser einschätzen zu können, sind allerdings weitere klinische und systematische Langzeitstudien notwendig. Auch hinsichtlich der wirksamsten Therapieregime besteht Bedarf an weiterer wissenschaftlicher Evidenz, beispielsweise hinsichtlich der Eradikation einer Infektion mit *P. aeruginosa* im Rahmen der CF [109, 116, 121].

Zur Untersuchung antibiotischer Synergie *in vitro* eignen sind unterschiedliche Methoden. Häufig genutzt wird die „Checkerboard-Methode“ mittels

Einleitung

Mikrobouillondilution, wie sie auch in dieser Arbeit Anwendung findet. Vorteile dieser recht aufwendigen Methode sind die Möglichkeit einer automatisierten und gut objektivierbaren Auswertung sowie die Testung von mehr als 2 Antibiotika in Kombination [122] [123].

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bakterielle respiratorische Infektionen bilden im Rahmen der CF nach wie vor den Prognose bestimmenden und limitierenden Faktor [19]. Antibiotische Kombinationen werden früh und häufig über lange Zeit eingesetzt und bilden einen wichtigen Grundpfeiler der klinischen Therapie [124]. Das hochkomplexe pulmonale Milieu, das Vorhandensein zahlreicher intrinsischer Resistenzmechanismen sowie die häufige Entwicklung weiterer Resistenzen führen zu langwieriger und zu häufig letztendlich frustrierender antibiotischer Therapie [59].

Trotz der breiten Anwendung im Rahmen der CF-Therapie ist die wissenschaftliche Evidenz und Datenlage hinsichtlich geeigneter Antibiotikakombinationen lückenhaft und es herrscht Bedarf an weiterem Verständnis synergistischer antibiotischer Effekte zur besseren Vorhersagbarkeit klinischer Effektivität [116].

Zusätzlich ist bisher die Übertragbarkeit mikrobiologischer *in vitro* Sensibilitätstestung auf den tatsächlichen klinischen Erfolg antibiotischer Kombinationen schlecht, wodurch keine flächendeckende Kombinationstestung *in vitro* durchgeführt wird.

Diese Arbeit zielt darauf ab, unterschiedliche Antibiotika sowie Kombinationen dieser Antibiotika *in vitro* hinsichtlich ihrer Effektivität sowie synergistischen Effekten gegenüber drei im Rahmen der CF bedeutsamen Bakterienspezies zu beurteilen. Untersucht wurden in diesem Rahmen verschiedene Bakterienstämme von *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* sowie dem *Burkholderia cepacia* Komplex.

Einleitung

Zur Anwendung kam primär die Methodik der manuellen Mikrobouillondilution, deren Ergebnisse wir anschließend mit weiteren Methoden der mikrobiologischen Sensibilitätstestung sowie unterschiedlichen automatisierten Testverfahren korrelierten. Wir haben das Ziel, eine Methodik zur Sensibilitätstestung zu etablieren, mit der eine flächendeckende und in der Routine anwendbare *in vitro* Testung antibiotischer Kombinationen im Rahmen der CF möglich ist.

Diese Arbeit fokussiert daher folgende Fragen:

Welche antibiotischen Kombinationen zeigen *in vitro* vielversprechende Wirksamkeit und synergistische Effekte gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* sowie dem BCC im Rahmen der Zystischen Fibrose und welche Methodik ist geeignet für antibiotische Kombinationstestung in der Routine der CF-Diagnostik?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät		Hersteller
Accujet pro	Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, D
BP 210 D Analytical Balance	Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Centrifuge 5424	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
DensiCHEK Plus	Trübungsdensitometer	Biomerieux, Marcy-l'Étoile, F
Eppendorf Research Plus (2-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Heraeus B 6030	Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Infinite 200 Pro	Multimode-Platten-Reader	Tecan, Männerdorf, CH
MiniSpin plus	Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Multitron	Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, D
RCT classic IKAMAG safety control	Magnetrührer	IKA, Staufen, D
Reax Top	Vortexmischer	Heidolph, Schwabach, D
Sartorius PICUS	12 Kanalpipette	Sartorius, Göttingen, D
Sunrise	Mikroplatten-Reader	Tecan, Männerdorf, CH
VITEK 2 XL	Resistenz-Bestimmung	Biomerieux, Marcy-l'Étoile, F

Material und Methoden

Tabelle 2: Labormaterialien

Material		Hersteller
Blaubrand Messpipetten Typ 1 (10 ml, 25 ml)	Messpipetten	Brand, Wertheim, D
Conical Centrifuge Tube 15 ml	Reaktionsgefäß	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Conical Tube 50 ml	Reaktionsgefäß	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
epT.I.P.S. Standard 0,1 - 10 µl	Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
epT.I.P.S. Standard 2 - 200 µl	Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Impföse 10 µl		Greiner, Frickenhausen, D
MICRONAUT-S MDR (E1- 114-046)	MRGN-Screening- Platten	Merlin, Bornheim- Hersel, D
Nunc 96 Well U Bottom	Microplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96 Well, U-Boden, Transparent	Microplatten	Greiner, Frickenhausen, D
Optifit Tips, 50 – 1200 µl	Pipettenspitzen	Sartorius, Göttingen, D
Pipettenspitzen 50 - 1000 µl	Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, D
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, D
Safe Lock Tubes 2 ml	Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, D
Tubes, 5ml, 75 x 12 mm, PS	Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, D

Material und Methoden

Tabelle 3: Nährmedien

Medium	Herstellung	Hersteller
Columbia Agar mit Schafsblut Plus		Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Mueller Hinton Medium		Sifin diagnostics GmbH, Berlin, D
BBL Mueller Hinton II Broth (MH-Nährmedium)	11g des Pulvers in 500 ml H ₂ O überführen, mittels Magnetrührer vollständig lösen und anschließend autoklavieren	BD, Franklin Lakes, USA
Endo Agar Nährmedium	36 g Endo Agar (Thermo Fisher) in 1 Liter VE-Wasser suspendieren. Zugabe von 5,5ml basischen Fuchsins (7,5%), bei 121°C 20 Minuten autoklavieren	Nährbodenküche, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen

Tabelle 4: Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Herstellung	Hersteller
DTT	0,01 g DTT auf 10 ml Nuclease Free Water	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Ethanol absolute p.A.		Pan Reac AppliChem, Darmstadt, D
Isotonische Kochsalzlösung (0,9 %) Nuclease-Free Water		Fresenius Kabi, Bad Homberg, D Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Material und Methoden

Tabelle 5: Antibiotika

Antibiotikum	Herstellung der Stammlösungen	Hersteller
Ceftazidime hydrate C3809	16 mg Ceftazidim in 1 ml VE-Wasser	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Colistin Sulfate Biochemica	2 mg Colistin in 1 ml VE-Wasser	Pan Reac AppliChem, Darmstadt, D
Meropenem PHR1772	4 mg in 1 ml VE-Wasser	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Moxifloxacin	5 mg Moxifloxacin in 1 ml VE-Wasser	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Sulfamethoxazol	19 mg Sulfamethoxazol und 1 mg Trimethoprim in 1 ml Ethanol (100%) für 1mg/ml Cotrimoxazol	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Tobramycin PHR 1079	1 mg in 1 ml VE-Wasser	Sigma Aldrich, Hamburg, D
Trimethoprim T7883		Sigma Aldrich, Hamburg, D
BD Sensi-Disc™ Ciprofloxacin 5 µg		BD, Franklin Lakes, USA
BD Sensi-Disc™ Moxifloxacin 5 µg		BD, Franklin Lakes, USA
Cefiderocol 30 µg Disc		Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, IT
MTS™ (MIC Test Strip)		Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, IT

Material und Methoden

Tabelle 6: Bakterienspezies und -stämme

Spezies	Stammbezeichnung	Beschreibung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RP1	CF Patientenisolat, Hannover[51]
	RP73	CF Patientenisolat, Hannover[125]
	NF 21470	CF Patientenisolat, Tübingen
	NF 25647 (NF 26)	CF Patientenisolat, Tübingen
	NF 26144	CF Patientenisolat, Tübingen
	PAO 1 PAO1/pBBR 1-MCS5	Laborstamm [126, 127] Laborstamm [128]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	AC 4	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 19	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 23	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 24	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 27	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 49	CF Patientenisolat, Tübingen
	AC 50 AC 52	CF Patientenisolat, Tübingen CF Patientenisolat, Tübingen
<i>Burkholderia cepacia</i> Komplex (Bcc)	BC 1	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 3	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 7	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 8	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 10	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 11	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC 12	CF Patientenisolat, Tübingen
	BC J2315	CF Patientenisolat [84]
	BC ATCC (17759)	Laborstamm, USA [129]

Tabelle 7: Systeme zur Resistenztestung

System	Hersteller
Vitek Karte AST-N232	Biomerieux, Marcy-l'Étoile, F
MICRONAUT-S MDR (E1-114-046)	Merlin, Bornheim-Hersel, D

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische/bakteriologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen auf Agar

Mittels einer Impföse wurden bei -80 °C eingefrorene Bakterien auf einem Nährboden aus Schafsblutagar ausgestrichen und für 18-24 h bei 37°C inkubiert. Die hier gewachsenen Bakterienkolonien wurden für anschließende Testungen weiterverwendet.

2.2.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen in Flüssigmedium

Zur Anzucht der Bakterien im Flüssigmedium wurde mit Hilfe einer Impföse eine Kolonie des jeweiligen Bakterienstammes von der Nährbodenplatte in 2 ml MH-Medium überführt und für 12 h bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert.

2.2.1.3 Sensibilitätstestungen der Bakterienstämme

I Sensibilitätstestung mittels Vitek

Zum Vergleich der ermittelten Antibiogramme in den weiteren Versuchen wurde eine Sensibilitätstestung mittels der in der Routinediagnostik verwendeten Methode durchgeführt (SOP AM-MI-132F des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des UKT). In einem ersten Schritt erfolgte die Herstellung einer Bakteriensuspension. Hierfür wurde das McFarland Messgerät mithilfe des zugehörigen Messröhrchens, das etwa zu einem Drittel mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt wurde, auf einen McFarland von 0 eingestellt. Mithilfe einer Impföse wurde anschließend eine kleine Menge Koloniematerial direkt von der entsprechenden Nährbodenplatte in das befüllte Röhrchen überführt und mittels eines Vortexers so lange gemischt, bis eine gleichmäßig getrübbte Suspension entstanden war. Die optische Dichte wurde mithilfe des McFarland Messgerätes erneut bestimmt. Sofern diese von dem McFarland Zielwert von 0,5 abwich, wurde mit der entsprechenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung verdünnt oder aber eine weitere Kolonie mittels einer Impföse

Material und Methoden

hinzugegeben und daraufhin erneut gemischt und gemessen. Dieser Prozess wurde wiederholt, bis eine optische Dichte von 0,5 erreicht war. Das Messröhrchen wurde anschließend zusammen mit einer entsprechenden Vitek Karte in eine Docking Station überführt, der Barcode der Karte erfasst und Karte und Messröhrchen in einem Carrier anschließend in den Vitek 2 XL gestellt. Dort wurden die Daten erfasst und anschließend eine Resistenztestung mittels automatisierter Mikrobouillondilution durchgeführt.

II Sensibilitätstestung mittels Agardiffusion

Als ergänzende Sensibilitätsprüfung erfolgte die Testung mittels Agardiffusion für Ciprofloxacin, Cefiderocol und Moxifloxacin (SOP AM-MI-138J des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des UKT). In einem ersten Schritt erfolgte ebenfalls die Herstellung einer Bakteriensuspension mit einem McFarland von 0,5 entsprechend der Beschreibung in 2.2.1.3 I. Anschließend wurde eine MH-Agarplatte mittels eines Wattestäbchens gleichmäßig mit der Bakteriensuspension bestrichen und das entsprechende Antibiotikaplättchen auf dem Agar platziert. Daraufhin wurde die Platte für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurde der Durchmesser des Hemmhofes in mm um das Plättchen herum gemessen. Die Beurteilung hinsichtlich der Sensibilität und Resistenz erfolgte nach den entsprechenden Grenzwerten der EUCAST (Version 14 vom 01.01.2024).

Als ergänzendes Testverfahren im Rahmen der gleichen Methodik erfolgte zudem eine Sensibilitätstestung mittels Epsilon-Tests (E-Test). Die Durchführung entsprach dem bereits beschriebenen Ablauf im Rahmen der Testung mittels Antibiotikaplättchen. Statt dieser wurden nun entsprechende E-Teststreifen verwendet, die exponentiell ansteigende Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums enthielten. Im Unterschied zu den ebenfalls verwendeten Antibiotikaplättchen erfolgte die Bestimmung der MHK durch Ablesen der angegebenen Antibiotikakonzentration am Schnittpunkt des Hemmhofes mit dem E-Teststreifen.

III Sensibilitätstestung mittels Mikrobouillondilution

III.1 Sensibilitätstestung mittels MRGN Screening-Platten

Als weiteres Vergleichsverfahren wurde eine zusätzliche Sensibilitätstestung mittels MICRONAUT-S MDR (E1-114-046) Screening-Platten durchgeführt. Diese beinhalteten nur eine Auswahl der von uns verwendeten Antibiotika (Colistin, Ceftazidim und Meropenem), lieferten uns damit jedoch wertvolle Informationen hinsichtlich der Vergleichbarkeit der verschiedenen Testverfahren. In einem ersten Schritt wurde eine Bakteriensuspension nach dem in 2.2.1.3 I beschriebenen Vorgehen auf einen McFarland von 0,5 eingestellt. 50 µl dieser Suspension wurden nun in 11 ml Mueller Hinton Medium überführt. Anschließend wurde jedes Well der 96-Well Platte mit 100 µl dieser Bakteriensuspension befüllt. Die Platten wurden mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und die abgedeckten Platten daraufhin für 22-24 h bei 37°C inkubiert.

III.2 Individuelle Sensibilitätstestung mittels 96-Well Testplatten

Herstellung von 96-Well Testplatten mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen

Zu Beginn wurden für die einzelnen Antibiotika Stammlösungen hergestellt. Dies erfolgte in einem Eppendorf Cup durch Zugabe entsprechender Mengen eines Antibiotikums in Pulverform zu dem jeweiligen Volumen steriler physiologischer Kochsalzlösung. Für die genauen Konzentrationen siehe 2.1 Tab. 5. Diese Stammlösungen wurden anschließend zur Herstellung weiterer Verdünnungen verwendet. Die Lagerung aller Antibiotikalösungen erfolgte bei -20 °C.

Material und Methoden

Zur Herstellung einer Testplatte wurde jedes der benötigten Wells mithilfe einer Multikanalpipette mit 50 μ l MH-Medium befüllt. In das Well, das die höchste Konzentration des Antibiotikums aufweisen sollte, wurden 50 μ l der entsprechenden Antibiotikallösung pipettiert. Diese Antibiotikallösung wurde zuvor aus der Antibiotikastammlösung in Abhängigkeit der später im jeweiligen Well benötigten Konzentration des Antibiotikums hergestellt. Aus dem Well mit der höchsten Konzentration wurden wiederum 50 μ l entnommen und in das folgende Well pipettiert, um auf diese Weise mithilfe einer Verdünnungsreihe die benötigten Endkonzentrationen zu erreichen. Letztendlich enthielt jedes Well 50 μ l mit Antibiotika versetzten MH-Mediums.

	MEM	MEM	COL	COL	TOB	TOB	CTZ	CTZ	COT	COT	MOX	MOX
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
B	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128
C	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
D	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
E	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
F	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
G	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
H	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Abbildung 2: Beispielhaftes Schema einer 96-Well Platte

Beispielhafte schematische Darstellung einer 96-Well Platte mit den Antibiotika Meropenem (MEM), Colistin (COL), Tobramycin (TOB), Ceftazidim (CTZ), Cotrimoxazol (COT) sowie Moxifloxacin (MOX) unter Angabe der jeweiligen Antibiotikakonzentration in μ g/ml. Im Rahmen dieser absteigenden Verdünnungsreihe enthielt jedes Well letztendlich 50 μ l.

Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TOB/ CTZ												
TOB/ CTZ												
TOB/ COL												
TOB/ COL												
TOB/ COL/ MEM												
TOB/ COL/ MEM												
COT/ TOB												
COT/ TOB												
TOB/ COL/ MEM												
TOB/ COL/ MEM												
TOB/ COL/ MEM												
TOB/ COL/ MEM												
A	32/4	32/4	4/4	4/4	4/4/16	4/4/16	4/32	4/32	2/4/8	2/4/8	1/2/2	1/2/2
B	16/4	16/4	4/2	4/2	4/4/8	4/4/8	2/32	2/32	2/4/4	2/4/4	1/2/1	1/2/1
C	8/4	8/4	2/2	2/2	4/2/16	4/2/16	1/32	1/32	2/4/2	2/4/4	1/1/1	1/1/1
D	4/4	4/4	1/2	1/2	4/2/8	4/2/8	0,5/32	0,5/32	2/2/2	2/2/2	1/1/0,5	1/1/0,5
E	2/4	2/4					2/32	2/32				
F	1/4	1/4					2/16	2/16				
G							2/8	2/8				
H							1/8	1/8				

Abbildung 3: Schema einer 96-Well Platte unterschiedlicher antibiotischer Zweifach- sowie Dreifachkombinationen

Dargestellt sind verschiedene in dieser Arbeit verwendete Antibiotikakombinationen. Es handelt sich um die Zweifachkombinationen Tobramycin (TOB) + Ceftazidim (CTZ), Tobramycin + Colistin (COL) und Cotrimoxazol (COT) + Tobramycin sowie die Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem (MEM). Angegeben ist zudem jeweils die Konzentration der einzelnen Kombinationspartner in µg/ml. Auch hier enthielt jedes Well letztendlich 50 µl.

Herstellung einer Bakteriensuspension und Beimpfen der Testplatten

Entsprechend der Vorgehensweise in 2.2.1.3 I wurde in einem ersten Schritt eine Bakteriensuspension hergestellt, diesmal mit einem Zielwert für die optische Dichte (McFarland) von 1,0.

Aus dieser Bakteriensuspension wurden anschließend 50 µl entnommen und in ein mit 11,5 ml MH-Medium befülltes Röhrchen überführt und durch Schwenken gemischt, um anschließend in eine Plastikschale gefüllt zu werden. Mithilfe einer Multikanalpipette wurden daraufhin in jedes Well der 96-Well Platte, das bereits 50 µl der Antibiotikallösung enthielt, 50 µl dieser Bakteriensuspension hinzugegeben, sodass jedes Well letztendlich mit einem Volumen von 100 µl befüllt war und einer Bakteriendichte von 5×10^5 KBE/ml. Damit entspricht die Vorgehensweise der von der EUCAST vorgegebenen Methodik (EUCAST reading guide for broth microdilution, Version 5.0, 1. Januar 2024).

Auf jeder Platte wurden jeweils 2 identische Verdünnungsreihen pro Antibiotikum hergestellt (Doppelbestimmung) (s. Abb. 2). Für jeden der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und jede Konzentration wurden insgesamt 3 dieser Testplatten an aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt, sofern es nicht anders angegeben ist.

Die befüllten Platten wurden mit Deckeln abgedeckt und für 22-24 h bei 37°C inkubiert.

Messung und Auswertung der Platten

Nach 22-24 Stunden Inkubation wurden die Platten ohne Abdeckung mithilfe des Tecan Infinite M200 Pro bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der in den einzelnen Wells gemessenen optischen Dichte. Als Grenzwerte zur Beurteilung der Sensibilität der Bakterien gegenüber den Antibiotika wurden die von der EUCAST festgelegten Grenzwerte für die jeweilige Bakterienspezies und das jeweilige Antibiotikum verwendet (Version 14 vom 01.01.2024). In den Fällen, in denen keine Grenzwerte der EUCAST existierten, wurde auf Grenzwerte der amerikanischen CLSI

Material und Methoden

zurückgegriffen. Existierten weder Grenzwerte der EUCAST noch der CLSI, so wurde versucht, Näherungswerte durch Vergleich mit verwandten Bakterienspezies oder Antibiotika mit ähnlichem Wirkmechanismus und definierten Grenzwerten zu erhalten.

Nach einer ersten Messung nach 22-24 Stunden wurden die Testplatten für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend erneut auf die gleiche Weise gemessen. Dies erfolgte auf Grund des langsamen Wachstums einiger Bakterienstämme. Wenn nicht anders angegeben beziehen sich jedoch die Ergebnisse und deren Interpretation auf die Messdaten nach 22-24 Stunden Inkubation, wie dies auch in der Routinediagnostik der mikrobiologischen Labore Standard und in den Richtlinien der EUCAST definiert ist.

Tabelle 8: Übersicht über die Grenzwerte der MHK für die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienspezies und Antibiotika. Für *P. aeruginosa* sowie *A. xylooxidans* erfolgte die Beurteilung anhand der aktuellen EUCAST Leitlinie (Version 14.0, 01.01.2024), für den *BCC* aufgrund fehlender Grenzwerte der EUCAST anhand der Vorgaben der CLSI (*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. CLSI supplement M100, 2024*).

Antibiotikum	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MHK-Grenzwerte		<i>Achromobacter xylooxidans</i> MHK-Grenzwerte		<i>Burkholderia cepacia</i> Komplex MHK-Grenzwerte	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
MEM	2	8	1	4	4	8
CTZ	0,001	8	0,001	8	8	16
COL	4	4	4	4	-	-
TOB	2	2	2	2	-	-
COT	-	-	0,125	0,125	2	2
MOX	-	-	-	-	4	8

2.2.3 Statistische Methoden sowie Auswertung synergistischer Effekte

Die Auswertung der Daten sowie die graphische Darstellung erfolgte mittels Graphpad Prism 9.

Zur Objektivierung synergistischer Effekte erfolgte für die jeweiligen Antibiotikakombinationen die Berechnung des Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). Hierfür wurden die Quotienten gebildet aus der MHK des jeweiligen Antibiotikums in Kombination, geteilt durch die MHK des einzelnen Antibiotikums. Die Quotienten der Kombinationspartner wurden anschließend addiert. Werte des FICI $\leq 0,5$ wurden hierbei als synergistisch gewertet, Werte $>0,5$ und ≤ 1 als additiv, >1 als indifferent, während ein FICI >4 als Zeichen für Antagonismus interpretiert wurde [130].

$$FICI = \frac{MHK_{A \text{ nach Kombination}}}{MHK_{A \text{ vor Kombination}}} + \frac{MHK_{B \text{ nach Kombination}}}{MHK_{B \text{ vor Kombination}}}$$

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Tübingen bewilligt und trägt das Aktenzeichen 116/2023A.

3 Ergebnisse

Der nun folgende Abschnitt 3.1 zeigt die Ergebnisse der Sensibilitätstestung mittels Mikrobouillondilution für die drei untersuchten Bakterienstämme *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*) sowie den *Burkholderia cepacia* Komplex (BCC). Verglichen wurden die experimentellen Daten mit den Ergebnissen unterschiedlicher bereits etablierter Methoden der Routinediagnostik.

Die Auswahl der Bakterienspezies erfolgte in enger Kooperation mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik des UKT unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz und der in einigen Fällen bereits vorliegenden Antibiogramme der Isolate. Bei dem überwiegenden Teil der Bakterienstämme handelte es sich um klinische Isolate von CF-Patient*innen der Kinderklinik Tübingen. Bei anderen handelte es sich um bereits in der Literatur bekannte und beschriebene Isolate, die als wertvoller Vergleich genutzt werden konnten (vgl. Tab. 6).

Für unsere Experimente nutzten wir die in Tabelle 5 aufgeführten Antibiotika. Die Auswahl erfolgte ebenfalls in enger Absprache mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik Tübingen. Die verwendeten Antibiotika werden zum überwiegenden Teil bereits in der Routinetherapie respiratorischer Infektionen bei Patient*innen mit Zystischer Fibrose eingesetzt (vgl. aktuelle AWMF S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“, Stand 27.09.2022). Ebenfalls wird auch ein Teil der Kombinationen bereits in der Therapie verwendet. Für diese Kombinationen fehlen allerdings häufig systematische *in vitro* Testungen und objektive Kenntnis über synergistische Effekte. Zudem verwendeten wir Kombinationen, die sich bereits in der Literatur in anderem Kontext als vielversprechend präsentiert hatten mit der Frage, ob diese Effekte auch auf CF-assoziierte Bakterienstämme übertragbar sind [115].

Ergebnisse

3.1 Sensibilitätstestung mittels Mikrobouillondilution

Für unsere Experimente nutzten wir die Methode der Mikrobouillondilution. In der Routinediagnostik wird diese Methode als ein Standard angewendet und ist daher ein in den Laboren bereits etabliertes Verfahren mit klaren Grenzwerten der EUCAST und anderer Gesellschaften. Für uns bot die Methode der manuellen Mikrobouillondilution die Möglichkeit, die Konzentration der Antibiotika individuell festzulegen und zudem auch verschiedene Kombinationen von Antibiotika *in vitro* zu testen. Diese Möglichkeit besteht bei anderen gängigen Standardverfahren wie dem E-Test oder der Agardiffusion (Plättchen) nicht. Die automatisierte Messung der MHK mittels des Vitek 2 Systems, das ebenfalls in der Routinediagnostik eingesetzt wird, ist für die Bestimmung von MHKs für Antibiotikakombinationen ebenso nicht geeignet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, in Zukunft 96-Well-Platten mit festgelegten Kombinationen und Konzentrationen von Antibiotika produzieren zu können, die sich in unseren Experimenten als vielversprechend erwiesen und als Kombination additive und synergistische Wirkungen zeigten. Diese könnten anschließend als schnelle und einfache Methode in die Routinediagnostik der Labore integriert werden, um speziell für die Testung von „Problemkeimen“ zum Beispiel bei CF-Patienten genutzt zu werden mit der Möglichkeit, auch Antibiotikakombinationen direkt *in vitro* untersuchen zu können.

3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

I Testung der einzelnen Antibiotika

P. aeruginosa ist assoziiert mit chronischen und antibiotisch schwer zu therapeutierenden respiratorischen Infektionen im Rahmen von CF-Erkrankungen. Der erste Teil unserer Experimente beschäftigte sich daher mit Isolaten dieser Bakterienspezies.

In einem ersten Schritt bestimmten wir die MHK der einzelnen Antibiotika gegenüber den ausgewählten Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 6) mittels manueller Mikrobouillondilution. Zur Beurteilung des Bakterienwachstums wurde die optische Dichte der Bakterienkulturen bei 600 nm nach 22-24 h Inkubation gemessen. Eine optische Dichte $> 0,1$ wurde entsprechend dem Standard zur automatisierten Messung der optischen Dichte mittels des Tecan Mikroplatten-Readers als Bakterienwachstum gewertet. Um eine entsprechende Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, nutzten auch wir die identischen Grenzwerte zur Auswertung unserer Ergebnisse. Dementsprechend wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration als MHK gewertet, bei der die optische Dichte unter 0,1 lag und somit nach Definition kein Wachstum zu verzeichnen war. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen zusammen mit einer Beurteilung hinsichtlich der Resistenz auf Grundlage der aktuellen EUCAST Leitlinie dargestellt (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>).

Wie auch in allen anderen Empfindlichkeitstestungen mittels Mikrobouillondilution wurde, sofern nicht anders angegeben, mit drei unabhängigen Testplatten (biologischen Replikaten) in jeweils doppelter Ausführung gearbeitet (technische Replikate) (n=6).

Zur Bestimmung der MHK wurde der Mittelwert der optischen Dichten aller 6 Messungen gebildet. Sofern dieser über 0,1 lag, wurde dies als Wachstum gewertet. Die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, die zu einem Mittelwert der optischen Dichten unter 0,1 führte, wurde daraufhin als MHK festgelegt.

Ergebnisse

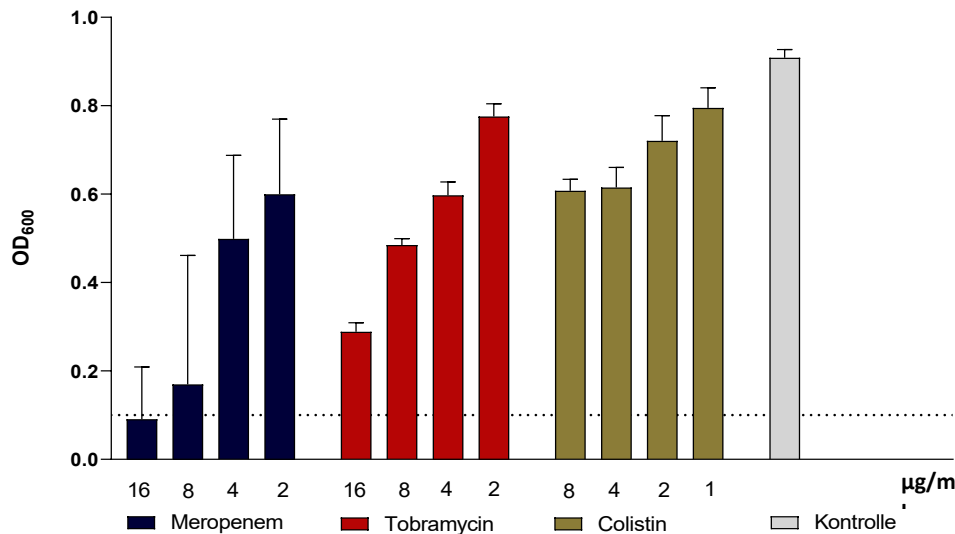


Abbildung 4: Exemplarische Wachstumsdarstellung des *P. aeruginosa* Isolates NF 21470 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration

Exemplarische Darstellung der optischen Dichten (OD) bei 600nm zur Beurteilung des Bakterienwachstums am Beispiel des *P. aeruginosa* Patientenisolates NF 21470 in Abhängigkeit der Konzentration des zugegebenen Antibiotikums (µg/ml). Die Kontrolle zeigt das Bakterienwachstum ohne Zugabe eines Antibiotikums. Eine OD von 0,1 stellt den Grenzwert für Wachstum dar. Das Experiment wurde in Form von 3 biologischen Replikaten, jeweils in Duplikaten durchgeführt.

In Abbildung 4 ist exemplarisch das Wachstum eines Bakterienstammes dargestellt, hier anhand des *Pseudomonas aeruginosa*-Isolates NF 21470. Gut zu erkennen ist die Zunahme des Bakterienwachstums, verdeutlicht durch den Anstieg der optischen Dichte, bei Verringerung der Konzentration des jeweiligen Antibiotikums. Außerdem ist der Grenzwert zur Definition von Bakterienwachstum bei einer optischen Dichte größer oder gleich 0,1 markiert, ab der in dieser Arbeit von Bakterienwachstum ausgegangen wird. Als MHK wurde somit die erste Konzentration unterhalb dieses Grenzwertes gewählt.

Die Ergebnisse der Bestimmung der MHK mittels Mikrobouillondilution für die ausgewählten *P. aeruginosa*-Isolate (Tab. 6) sind in der folgenden Tabelle 9

Ergebnisse

dargestellt. Zudem ist die Beurteilung der jeweiligen MHK hinsichtlich Sensibilität (S) bzw. Resistenz (R) nach der EUCAST Leitlinie (Version 14.0, 01.01.2024) angegeben. (I) spricht nach neuer Definition für Sensibilität bei erhöhter Dosis des jeweiligen Antibiotikums.

Tabelle 9: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme von *P. aeruginosa* gegenüber Meropenem (MEM), Ceftazidim (CTZ), Colistin (COL) und Tobramycin (TOB) in µg/ml sowie eine Beurteilung auf Grundlage der aktuellen EUCAST Leitlinie (Version 14.0, 01.01.2024) (Sensibilität (S), Sensibilität bei erhöhter Dosis (I), Resistenz (R))

	Meropenem		Ceftazidim		Colistin		Tobramycin	
RP 1	< 2	S	< 4	I	4	S	< 2	S
RP 73	8	I	32	R	2	S	4	R
NF 21470	8	I	32	R	4	S	> 16	R
NF 25647	16	R	> 32	R	4	S	< 2	S
NF 26144	16	R	16	R	4	S	< 2	S

Es wurde außerdem die MHK der Bakterienstämme noch einmal mit in der Routinediagnostik etablierten Testverfahren ermittelt, um sie mit den Ergebnissen der manuellen Mikrobouillondilution zu vergleichen und unsere Methode zu verifizieren. Zur Anwendung kamen die MRGN-Screening-Platten MICRONAUT-S MDR (E1-114-046) sowie die Messung mittels den VITEK 2 XL-Karten (AST-N232) beziehungsweise mittels Agardiffusion (E-Test).

Da grundsätzlich keine Testung von Colistin mit den VITEK 2 XL-Karten sowie dem E- Test erfolgen konnte, wurde hierfür stattdessen eine Testung mittels der in der Routine verwendeten Mikrobouillondilution durchgeführt. Im Umfang der MRGN-Screening Platten (merlin) ist dagegen Tobramycin nicht enthalten und konnte daher mittels dieser Methodik nicht getestet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 10: Darstellung der MHK in µg/ml auf Grundlage etablierter Routinemethoden zur Resistenztestung. Dargestellt sind die Ergebnisse aus der Testung mittels MRGN Screening Platten (merlin) und den Routineverfahren E-Test, Mikrobouillondilution und VITEK (Routine) sowie eine Beurteilung hinsichtlich Sensibilität und Resistenz (Sensibilität (S), Sensibilität bei erhöhter Dosis (I), Resistenz (R)).

	Tobramycin		Meropenem		Ceftazidim		Colistin	
	merlin	Routine	merlin	Routine	merlin	Routine	merlin	Routine
RP 1	-	0,75 (S)	1 (S)	0,19 (S)	≤ 0,25 (I)	1,5 (I)	≤ 1 (S)	1 (S)
RP 73	-	6 (R)	8 (I)	8 (I)	16 (R)	24 (R)	2 (S)	1 (S)
NF 21470	-	24 (R)	1 (S)	4 (I)	2 (I)	4 (I)	≤ 1 (S)	1 (S)
NF 25647	-	1,5 (S)	4 (I)	8 (I)	128 (R)	>256 (R)	2 (S)	4 (S)
NF 26144	-	8 (R)	4 (I)	4 (I)	4 (I)	>64 (R)	2 (S)	2 (S)

In Zusammenschau der Ergebnisse konnten für die verwendeten Isolate von *P. aeruginosa* zwischen den unterschiedlichen Verfahren zur Sensibilitätstestung bisweilen deutliche Abweichungen festgestellt werden. Mögliche Ursachen und Konsequenzen für die Routinetestung und Therapie werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert.

II Testung von Antibiotikakombinationen

II.1 Testung von Zweifachkombinationen

Nach der Etablierung der Methodik für einzelne Antibiotika erfolgte die Testung von Antibiotikakombinationen mittels manueller Mikrobouillondilution. Wenn nicht anders angegeben, wurde auch jede Kombination für einen Bakterienstamm auf drei unabhängigen Testplatten in jeweils doppelter Ausführung getestet (n=6).

Zur Sensibilitätstestung der ausgewählten Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* wurden die Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim sowie Tobramycin + Colistin verwendet.

Ziel unserer Experimente war es, die Wirksamkeit von Antibiotikakombinationen mit der Wirkung der einfachen Antibiotika zu vergleichen. Dabei sollten mögliche

Ergebnisse

Unterschiede in der Wirksamkeit für die Nutzung von Antibiotikakombinationen gegenüber der Nutzung einzelner Antibiotika abgegrenzt werden, z.B. in Form synergistischer und additiver Effekte der jeweiligen Kombination. Die Ergebnisse der Experimente sind in den folgenden Tabellen und Graphiken dargestellt.

Tabelle 11: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim und Tobramycin + Colistin in µg/ml gegenüber den verwendeten Bakterienstämmen nach 24 h Inkubation bei 37°C. Der erste Wert der MHK gibt die benötigte Konzentration des erstgenannten Antibiotikums an, der zweite Wert der MHK die benötigte Konzentration des zweitgenannten Antibiotikums.

	RP1	RP 73	NF 21470	NF 25647	NF 26144
TOB + CTZ	< 2 / 8	< 1 / 8	< 1 / 8	< 2 / 8	< 1 / 8
TOB + COL	< 2 / 2	< 2 / 4	< 2 / 4	< 2 / 2	< 2 / 4

Aus den in Tab. 11 angegebenen Werten lässt sich bereits eine gute Wirksamkeit beider Antibiotikakombinationen gegenüber allen hier getesteten Isolaten von *P. aeruginosa* ablesen. Wenngleich sich die Stämme häufig bereits schon dem einzelnen Antibiotikum gegenüber als ausreichend sensibel präsentierten (vgl. Tab. 9), so konnte doch zumindest bei einem Teil der getesteten Stämme durch Kombination der Antibiotika die MHK von mindestens einem der Kombinationspartner noch einmal um ein Vielfaches gesenkt werden. So konnte beispielsweise im Falle von RP 73 und NF 21470 die MHK für Tobramycin und Ceftazidim durch Kombination der beiden Antibiotika um jeweils das Vierfache im Vergleich zur Einzelnutzung reduziert werden (vgl. Tab. 9 und 11). Durch die gute Wirksamkeit der hier gezeigten Antibiotikakombinationen gelang es in unseren Experimenten nicht, die Konzentration der Antibiotika so weit zu senken, als dass wieder bakterielles Wachstum beobachtet werden konnte. Die tatsächliche MHK der Kombinationen läge also noch einmal unterhalb der hier angegebenen Konzentrationen.

Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen findet sich ein Vergleich der MHK zwischen den einzelnen Antibiotika und der Antibiotika in Kombination gegenüber den getesteten Stämmen von *P. aeruginosa*. Dargestellt sind hier ausschließlich die Isolate, für die nicht bereits die Verwendung des einzelnen Antibiotikums zu einer vollständigen Wachstumshemmung führte (s. Abb. 5-7). In den anderen Fällen konnte keine objektive Beurteilung hinsichtlich möglicher Wirkunterschiede zwischen dem einzelnen Antibiotikum und der Kombination erfolgen, da die Untergrenze der antibiotischen Wirksamkeit nicht erreicht werden konnte.

Begonnen wird mit der Darstellung der Ergebnisse für die Kombination Tobramycin und Ceftazidim.

Kombination Tobramycin + Ceftazidim

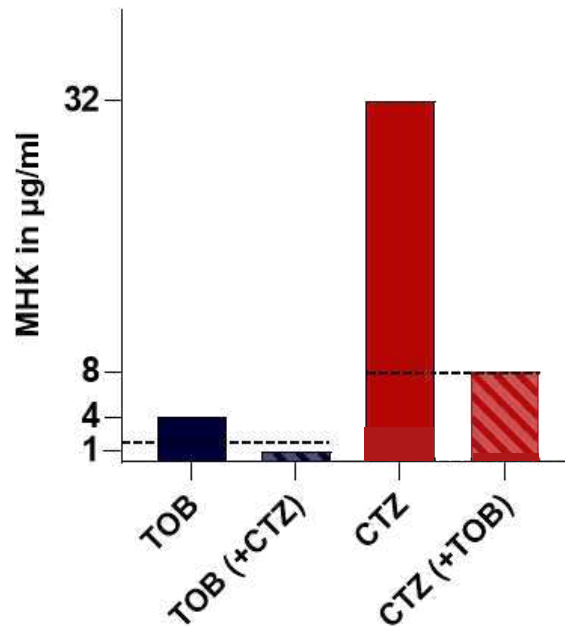


Abbildung 5: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber *P. aeruginosa* RP 73

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB und CTZ. Die schraffierten Balken zeigen an, dass die tatsächliche MHK noch einmal unterhalb des dargestellten Wertes liegt. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität angezeigt.

Sowohl für Tobramycin als auch für Ceftazidim führte eine Kombination beider Antibiotika zu einer klaren Reduktion der MHK. Im Falle von Tobramycin führte die Kombination zu einer Absenkung in den sensiblen Bereich, für Ceftazidim konnte die MHK von Werten deutlich über der Grenze für Resistenz zumindest auf die Grenze des sensiblen Bereiches abgesenkt werden. Wie weit die MHK für die Kombination noch hätte gesenkt werden können, lässt sich mit unseren Ergebnissen nicht beantworten. Doch bereits so ergibt sich ein Wert für den FICI von <0,5. Dies spricht für eindeutig synergistische Effekte der Kombination.

Ergebnisse

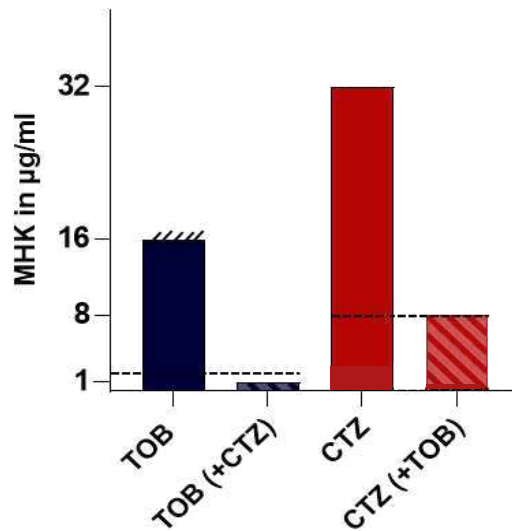


Abbildung 6: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber *P. aeruginosa* NF 21470

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB und CTZ. Die schraffierten Balken zeigen an, dass die tatsächliche MHK noch einmal unterhalb des dargestellten Wertes liegt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität angezeigt.

Auch für das *P. aeruginosa*-Isolat NF 21470 führte eine Kombination beider Antibiotika zu einer eindeutigen Reduktion der jeweiligen MHK. Für Tobramycin konnte die MHK erneut bis in den sensiblen Bereich gesenkt werden. Für Ceftazidim konnte die MHK zumindest bis zur Obergrenze des Bereiches reduziert werden, in dem von Sensibilität auszugehen ist. Der FICI von < 0,31 zeigt auch für diesen Stamm deutlich synergistische Effekte der Kombination an.

Für die übrigen Isolate von *P. aeruginosa* konnte hinsichtlich der Wirksamkeit der Kombination Tobramycin und Ceftazidim keine eindeutige Aussage im Vergleich zur Wirksamkeit der einzelnen Antibiotika getroffen werden. In den meisten Fällen liegt dies darin begründet, dass sich die Isolate, wie in Tab. 9 und 11

Ergebnisse

angegeben, bereits bei niedrigster Antibiotikakonzentration sensibel gezeigt hatten und es damit nicht möglich war, die MHK noch einmal weiter zu senken.

In den folgenden Abbildungen werden nun die Ergebnisse für die Kombination aus Tobramycin und Colistin dargestellt.

Ergebnisse

Kombination Tobramycin + Colistin

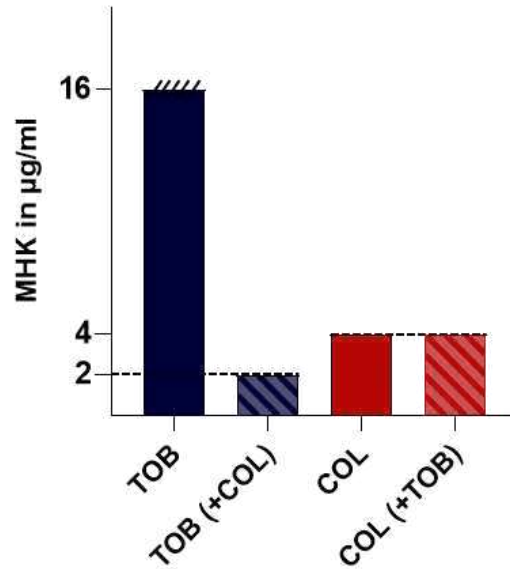


Abbildung 7: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber *P. aeruginosa* NF 21470

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und COL einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL. Die schraffierten Balken zeigen an, dass die tatsächliche MHK noch einmal unterhalb des gezeigten Wertes liegt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz.

Im Falle von *P. aeruginosa* NF 21470 (Abb. 7) zeigte sich eine klare Reduktion der MHK für Tobramycin durch die Kombination mit Colistin. Hierdurch konnte die Konzentration für Tobramycin bis in den sensiblen Bereich gesenkt werden. Der Wert für die MHK von Colistin hingegen konnte durch die Verwendung der Kombination nicht weiter gesenkt werden. Allerdings liegt der tatsächliche Wert für die MHK von Colistin in Kombination mit Tobramycin noch einmal unterhalb des in Abb. 7 dargestellten Wertes. Im Rahmen unserer Experimente konnte die

Ergebnisse

verwendeten Konzentrationen nicht ausreichend gesenkt werden, als dass ein eindeutiger Wert für die Untergrenze der antibiotischen Wirksamkeit hätte erreicht werden können. Daher ergibt sich ein FICI von $<1,1$, der ebenfalls keine eindeutige Aussage zulässt über mögliche additive oder synergistische Effekte.

Dieses Phänomen ließ sich auch für die übrigen Isolate von *P. aeruginosa* beobachten. In einigen Fällen konnte bereits für das einfache Antibiotikum kein eindeutiger unterer Grenzwert für die MHK ermittelt werden, da sich die Isolate gegenüber Colistin sehr sensibel zeigten. In anderen Fällen konnte, wie in Abb. 7 dargestellt, die Antibiotikakonzentration für die Kombination aufgrund ihrer guten antimikrobiellen Wirksamkeit nicht soweit gesenkt werden, dass wieder bakterielles Wachstum zu beobachten war. Dadurch konnte die tatsächliche MHK nicht definitiv bestimmt werden und somit keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Effektivität der Kombination verglichen zum einzelnen Antibiotikum getroffen werden.

II.2 Testung von Dreifachkombinationen

Neben den bereits beschriebenen Zweifachkombinationen untersuchten wir in unseren Experimenten die Dreifachkombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem für die Bakterienstämme *P. aeruginosa* NF 21470 sowie NF 26144. Unser Ziel bestand im Vergleich der Zweifachkombinationen mit der Dreifachkombination hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und einer möglichen Verstärkung additiver oder synergistischer Effekte durch Hinzunahme eines dritten Antibiotikums. Für die Etablierung der Dreifachtestung wählten wir

Ergebnisse

insbesondere NF 21470 aufgrund der erhöhten Resistenz gegenüber den einzelnen Antibiotika aus (vgl. Tab. 9).

Tabelle 12: Darstellung der MHK der *P. aeruginosa* Patientenisolate NF21470 und NF2644 gegenüber der Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem in µg/ml nach 24 h Inkubation bei 37°C.

	NF 21470	NF 26144
TOB + COL + MER	< 2 / 2 / 8	< 2 / 2 / 8

In unseren Experimenten ließ sich durch die Dreifachkombination aus Tobramycin, Colistin und Meropenem eine vollständige Inhibition des Bakterienwachstums erreichen. Allerdings konnte durch unsere Experimente kein eindeutiger unterer Grenzwert für die MHK ermittelt werden, da die Dreifachkombination noch bei niedrigster Konzentration eine ausreichende antibiotische Wirksamkeit aufwies. Die tatsächliche MHK liegt also noch einmal unterhalb der in Tab. 12 angegebenen Konzentrationen.

Ergebnisse

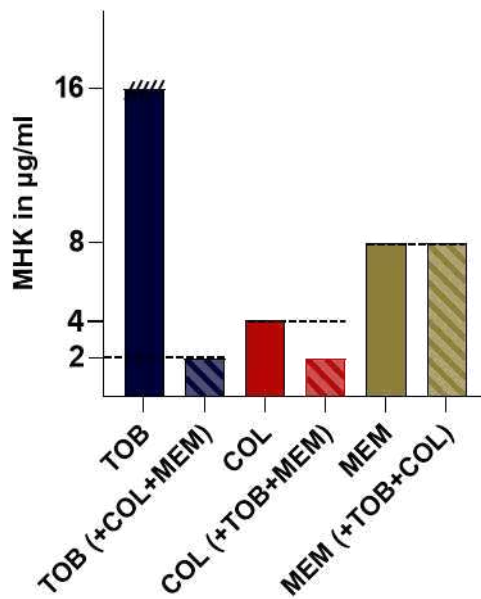


Abbildung 8: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber *P. aeruginosa* NF 21470

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Die schraffierten Balken zeigen an, dass die tatsächliche MHK noch einmal unterhalb des dargestellten Wertes liegt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität

Durch Verwendung der Dreifachkombination konnte das Wachstum von NF 21470 vollständig unterbunden werden (Abb. 8). Die MHK konnte in unseren Versuchen für Tobramycin und Colistin eindeutig gesenkt werden. In beiden Fällen konnte der Bereich für Sensibilität (nach EUCAST) entweder durch die Kombination überhaupt erst erreicht werden (TOB) oder die Konzentration innerhalb des Bereiches noch einmal deutlich gesenkt werden (COL). Lediglich

Ergebnisse

für Meropenem gelang keine Reduktion der MHK im Vergleich zum einzelnen Antibiotikum. Daher ergab sich für den FICI ein Wert von $<1,6$, der keine eindeutigen Rückschlüsse hinsichtlich Synergie oder additiven Effekten zulässt.

Wieweit die MHK für die Dreifachkombination noch in den Bereich synergistischer Effekte hätte gesenkt werden können, lässt sich mit den Ergebnissen dieser Experimente nicht beantworten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für NF 26144. Auch hier gelang die Reduktion der MHK nur für 2 der 3 Antibiotika ohne die Möglichkeit eindeutiger Rückschlüsse auf Synergie.

3.1.2 *Achromobacter xylosoxidans*

I Testung der einzelnen Antibiotika

Der zweite Abschnitt unserer Resistenztestung mittels manueller Mikrobouillondilution beschäftigte sich mit der Bakterienspezies *Achromobacter xylosoxidans*. Auch diese Gattung ist assoziiert mit chronischen und häufig schwer zu therapierenden respiratorischen Infektionen. Ein Grund hierfür sind zahlreiche natürliche Antibiotikaresistenzen.

Die Testungen mittels Mikrobouillondilution wurden auf die gleiche Weise durchgeführt wie für *P. aeruginosa* und umfassten erneut die Sensibilitätstestung für die Antibiotika Meropenem, Ceftazidim, Colistin und Tobramycin. Zusätzlich wurde für *A. xylosoxidans* Cotrimoxazol neu hinzugenommen. Für Tobramycin, Ceftazidim und Colistin sind keine Grenzwerte für Sensibilität und Resistenz von der EUCAST definiert, in der Routinediagnostik werden allerdings in diesen Fällen aufgrund der nahen Verwandtschaft beider Arten die für *P. aeruginosa* definierten Grenzwerte als Orientierung verwendet. Diese Vorgehensweise wurde für diese Arbeit übernommen.

Ergebnisse

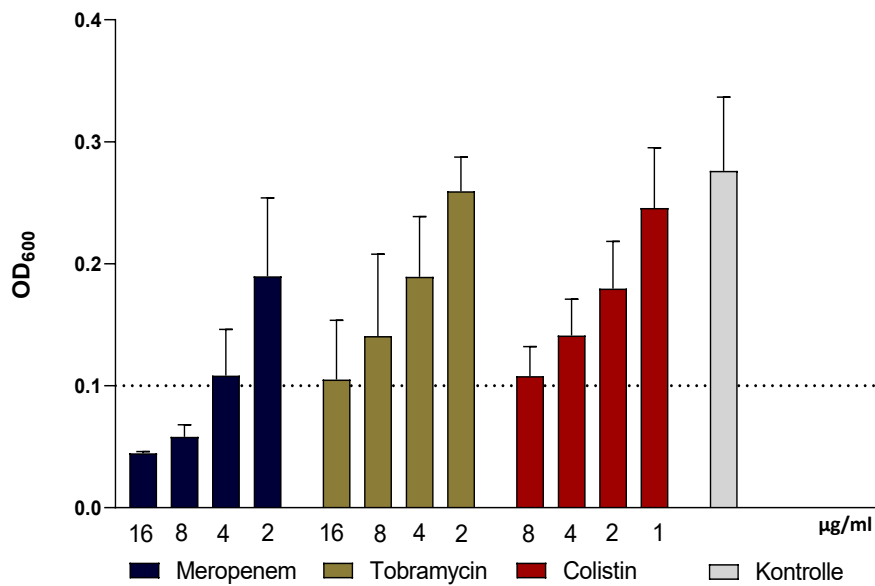


Abbildung 9: Exemplarische Wachstumsdarstellung des *A. xylosoxidans* Isolates AC 27 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration

Exemplarische Darstellung der optischen Dichten (OD) bei 600nm zur Beurteilung des Bakterienwachstums am Beispiel des *A. xylosoxidans* Patientenisolates AC 27 in Abhängigkeit der Konzentration des zugegebenen Antibiotikums (µg/ml). Die Kontrolle zeigt das Bakterienwachstum ohne Zugabe eines Antibiotikums. Eine OD von 0,1 stellt den Grenzwert für Wachstum dar. Das Experiment wurde in Form von 3 biologischen Replikaten, jeweils in Duplikaten durchgeführt.

Gut zu erkennen ist auch hier in Abbildung 9 die Zunahme der optischen Dichte, entsprechend einer Zunahme des Bakterienwachstums, bei Reduktion der Konzentration des hinzugegebenen Antibiotikums. Erneut wurde eine optische Dichte von 0,1 als Grenzwert für die Definition von Wachstum verwendet.

Ergebnisse

Tabelle 13: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme von *A. xylosoxidans* gegenüber Meropenem (MEM), Ceftazidim (CTZ), Colistin (COL) und Tobramycin (TOB) in µg/ml sowie eine Beurteilung auf Grundlage der aktuellen EUCAST Leitlinie (Version 14.0, 01.01.2024) (Sensibilität (S), Sensibilität bei erhöhter Dosis (I), Resistenz (R))

	Meropenem		Ceftazidim		Colistin		Tobramycin	
AC 4	< 2	S	< 4	I	< 1	S	4	R
AC 19	> 16	R	< 4	I	< 1	S	4	R
AC 23	8	R	> 32	R	8	R	250	R
AC 27	8	R	32	R	16	R	64	R
AC 49	8	R	16	R	> 64	R	> 128	R
AC 50	< 2	S	< 4	I	2	I	> 16	R

In den Sensibilitätstestungen der einzelnen Antibiotika zeigte sich ein heterogenes Ansprechen der Isolate von *A. xylosoxidans*. Einzig die intrinsische Resistenz von *A. xylosoxidans* gegenüber Aminoglykosiden (hier Tobramycin) zeigte sich bei allen von uns verwendeten Stämmen. Wie bereits für *P. aeruginosa* beschrieben, bestimmten wir für *A. xylosoxidans* ebenfalls die MHK der verwendeten Stämme noch einmal mit zwei in der Routinediagnostik etablierten Testverfahren, um sie mit den Ergebnissen der manuellen Mikrobouillondilution zu vergleichen und unsere Methodik zu verifizieren. Zur Anwendung kamen die MRGN-Screening-Platten MICRONAUT-S MDR (E1-114-046, merlin) sowie die Messung mittels den VITEK 2 XL-Karten (AST-N232).

Ergebnisse

Tabelle 14: Darstellung der MHK in µg/ml auf Grundlage etablierter Routinemethoden zur Resistenztestung mittels MRGN Screening-Platten (merlin) sowie den VITEK 2 XL-Karten (VITEK) inklusive Beurteilung hinsichtlich Sensibilität und Resistenz (Sensibilität (S), Indifferenz (I), Resistenz (R)).

	Tobramycin		Meropenem		Ceftazidim		Colistin	
	merlin	VITEK	merlin	VITEK	merlin	VITEK	merlin	VITEK
AC 4	-	12 (R)	0,5 (S)	0,19 (S)	2 (I)	2 (I)	≤ 1 (S)	0,25 (S)
AC 19	-	48 (R)	64 (R)	> 32 (R)	32 (R)	24 (R)	≤ 1 (S)	1 (S)
AC 23	-	> 256 (R)	-	> 32 (R)	-	>256 (R)	-	4 (I)
AC 27	-	> 256 (R)	-	> 32 (R)	-	>256 (R)	-	16 (R)
AC 49	-	> 256 (R)	-	> 32 (R)	-	48 (R)	-	> 64 (R)
AC 50		> 16 (R)	-	0,25 (S)	-	3 (I)	-	4 (I)

In der Zusammenschau der Ergebnisse aus Tab. 13 und 14 zeigen sich für *A. xylosoxidans* im Gegensatz zu unseren Versuchen mit Stämmen von *P. aeruginosa* (vgl. Tab. 9 und 10) keine relevanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Testverfahren.

II Testung von Antibiotikakombinationen

II.1 Testung von Zweifachkombinationen

Nach Bestimmung der MHK für die einzelnen Antibiotika erfolgte anschließend die Testung von Zweifachkombinationen. Die Auswahl der Antibiotika erfolgte ebenfalls in enger Absprache mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik des UKT Tübingen. Unsere Versuche beinhalteten die Kombinationen Tobramycin + Ceftazidim sowie Tobramycin + Colistin.

Tabelle 15: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim sowie Tobramycin + Colistin in µg/ml gegenüber den verwendeten Bakterienstämmen nach 24 h Inkubation. Der erste Wert der MHK gibt die benötigte Konzentration des erstgenannten Antibiotikums an, der zweite Wert der MHK die benötigte Konzentration des zweitgenannten Antibiotikums.

	TOB + CTZ	TOB + COL
AC 4	< 2/4	< 2/4
AC 19	< 2/4	< 2/4
AC 23	64/64	1/2
AC 27	> 16/4	4/8
AC 49	> 16/4	> 4/8
AC 50	< 2/4	< 2/4

Entsprechend unseren Ergebnissen im Rahmen der Sensibilitätstestung der einzelnen Antibiotika (s. Tab. 13 + 14) zeigte sich auch bei Kombinationstestung (Tab. 15) ein heterogenes Ansprechen der von uns getesteten Stämme von *A. xylosoxidans*. Die Stämme *A. xylosoxidans* AC 4, AC 19 sowie AC 50 zeigten sich beiden Kombinationen gegenüber bis zur niedrigsten für uns erreichbaren Konzentration sensibel. Somit konnten wir in diesen Fällen keine definitiven Werte für die MHK bestimmen, die somit noch einmal unterhalb der hier dargestellten Konzentrationen läge. Die Stämme *A. xylosoxidans* AC 23, AC 27

Ergebnisse

sowie AC 49 präsentierten sich dagegen insbesondere der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber weitgehend resistent.

In den folgenden Abbildungen findet sich ein Vergleich der MHK des einzelnen Antibiotikums mit der MHK des jeweiligen Antibiotikums in Kombination. Dargestellt sind die Ergebnisse der Stämme, für die sich eindeutige Grenzwerte für die Sensibilität bestimmen ließen und damit eine eindeutige Aussage hinsichtlich möglicher Synergien möglich war.

Begonnen wird auch hier mit der Antibiotikakombination Tobramycin und Ceftazidim.

Kombination Tobramycin + Ceftazidim

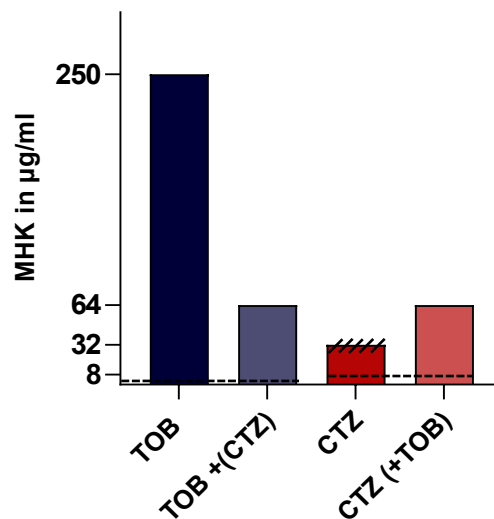


Abbildung 10: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + CTZ. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze für die MHK bestimmt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal oberhalb der hier dargestellten Konzentration liegt.

Ergebnisse

Durch Verwendung der Zweifachkombination Tobramycin + Ceftazidim ließ sich in unseren Experimenten die MHK für Tobramycin durch Kombination mit Ceftazidim gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23 klar senken, allerdings ohne damit den nach EUCAST sensiblen Bereich zu erreichen (Abb. 10). Die MHK für Ceftazidim lag auch in Kombination mit Tobramycin deutlich oberhalb der Grenze für Sensibilität, ab der nach EUCAST ein klinisches Ansprechen sehr wahrscheinlich wäre.

Dadurch, dass für Ceftazidim einzeln gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23 (vgl. Tab. 13) aufgrund der ausgeprägten Resistenz des Stammes keine definitive MHK bestimmt werden konnte, kann keine eindeutige Aussage hinsichtlich synergistischer Effekte getroffen werden.

Auch die Stämme *A. xylosoxidans* AC 27 und AC 49 zeigten sich der Kombination TOB + CTZ gegenüber resistent. Die restlichen Stämme von *A. xylosoxidans* sprachen dagegen gut auf die Kombination an. Die MHK für Tobramycin lag hierbei stets im sensiblen Bereich, für Ceftazidim konnte der Bereich der Sensibilität bei erhöhter Dosis erreicht werden (vgl. Tab. 15).

In den folgenden Abbildungen werden nun die Ergebnisse für die Antibiotikakombination Tobramycin und Colistin dargestellt.

Ergebnisse

Kombination Tobramycin + Colistin

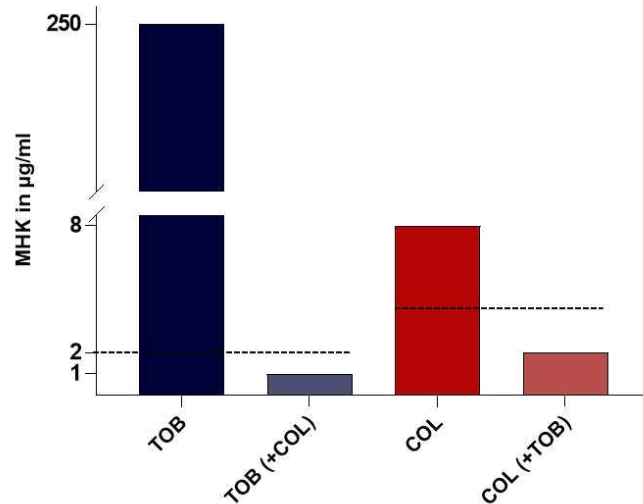


Abbildung 11: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und COL einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB und COL. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer

Durch Kombination der Antibiotika Tobramycin und Colistin gelang es gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23, die MHK für Tobramycin um das 250-fache bis unterhalb der Sensibilitätsgrenze zu senken. Die MHK für Colistin konnte durch die Kombination mit Tobramycin auf ein Viertel der MHK des einzelnen Antibiotikums gesenkt werden und lag damit im sensiblen Bereich. Beiden einzelnen Antibiotika gegenüber hatte sich *A. xylosoxidans* AC 23 resistent gezeigt (vgl. Tab. 13).

Die Berechnung des FICI ergab einen Wert von 0,254, der deutlich unterhalb der Grenze für Synergie von 0,5 liegt und damit eindeutig synergistische Wirkung der Kombination Tobramycin + Colistin zeigt.

Ergebnisse

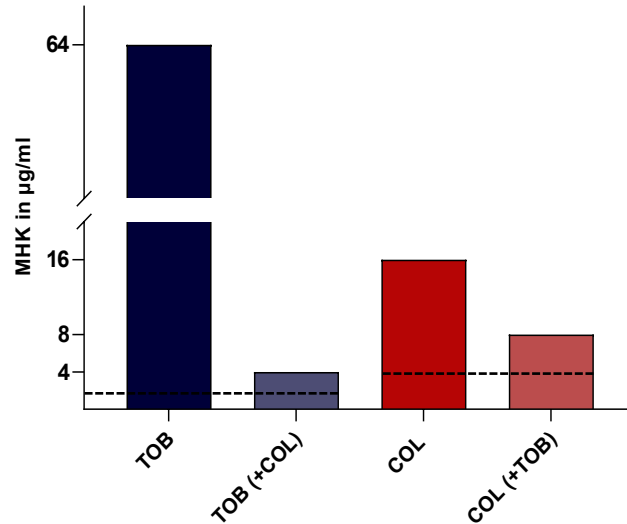


Abbildung 12: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber *A. xylosoxidans* AC 27

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und COL einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte auch im Falle von *A. xylosoxidans* AC 27 die MHK sowohl für Tobramycin als auch für Colistin durch eine Kombination beider Antibiotika eindeutig gesenkt werden, für Tobramycin um das 16-fache, für Colistin auf die Hälfte. In beiden Fällen lagen die MHK jedoch nach wie vor außerhalb des sensiblen Bereiches.

Bei Berechnung des FICI ergab sich ein Wert von 0,56, der damit knapp über der Grenze für Synergie liegt, allerdings weiterhin klar im Bereich der additiven Wirkung.

Ergebnisse

II.2 Testung von Dreifachkombinationen

Neben den bereits beschriebenen Zweifachkombinationen testeten wir in unseren Experimenten die Dreifachkombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem auch für einige Isolate von *A. xylosoxidans*. Unser Ziel bestand in dem Vergleich der Zweifachkombinationen mit der Dreifachkombination hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und möglicher Veränderungen in der Ausprägung additiver oder synergistischer Effekte durch Hinzunahme eines dritten Antibiotikums.

Tabelle 16: Darstellung der MHK der *A. xylosoxidans* Isolate gegenüber der Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem in µg/ml nach 24 h Inkubation bei 37°C.

	AC 4	AC 19	AC 23	AC 27	AC 49
TOB/COL/MER	< 4/2/8	< 4/2/8	2/4/2	2/4/8	2/4/8

Durch Verwendung der Dreifachkombination aus Tobramycin, Colistin und Meropenem konnte bei allen getesteten Bakterienstämmen eine vollständige Wachstumsinhibition erreicht werden. Ein Vergleich mit der Wirksamkeit der einzelnen Antibiotika findet sich in den folgenden Abbildungen.

Ergebnisse

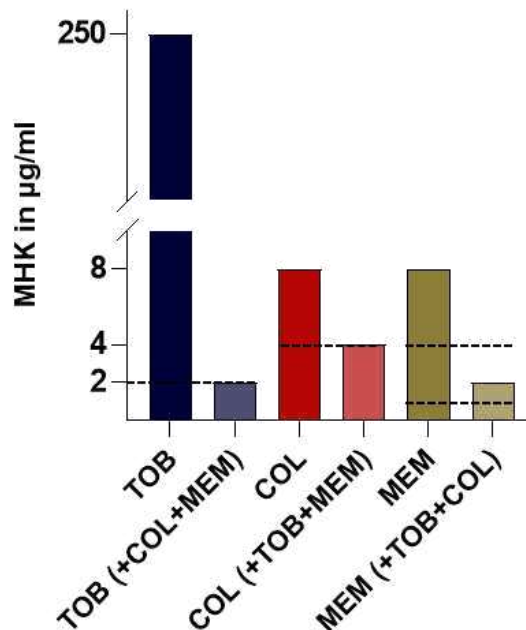


Abbildung 13: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber *A. xylosoxidans* AC 23

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz.

Während bei Verwendung der einzelnen Antibiotika die MHK aller drei Antibiotika gegenüber *A. xylosoxidans* AC23 deutlich außerhalb des sensiblen Bereiches lag (vgl. auch Tab. 13), so konnte durch die Kombination der drei Antibiotika die MHK für Tobramycin und Colistin bis in den sensiblen Bereich gesenkt werden und für Meropenem in den Bereich der Sensibilität bei erhöhter Dosis (I) (Abb. 14). Bei Berechnung des FICI ergab sich ein Wert von 0,75, der damit außerhalb der expliziten Synergie, aber doch deutlich im Bereich additiver Effekte liegt.

Ergebnisse

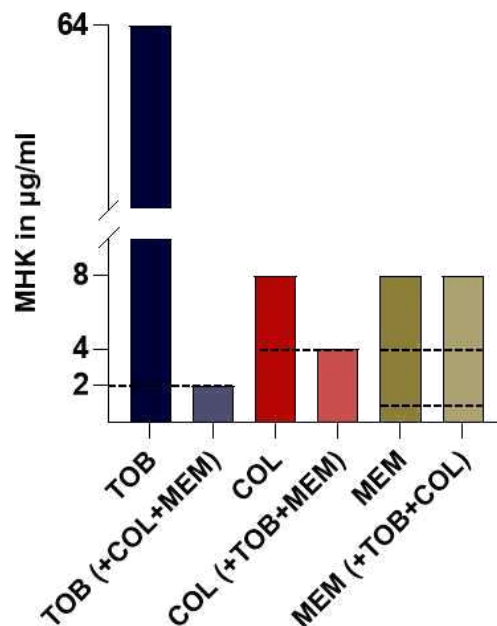


Abbildung 14: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber *A. xylosoxidans* AC 27

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz.

Im Falle des *A. xylosoxidans*-Isolates AC 27 konnte durch Kombination der drei Antibiotika die MHK für Tobramycin und Colistin deutlich gesenkt werden (Abb. 13). In beiden Fällen lag die MHK nach Kombination im sensiblen Bereich. Für Meropenem konnte dagegen keine Reduktion der MHK erreicht werden, welche sowohl bei Verwendung des einzelnen Antibiotikums als auch in Kombination im resistenten Bereich lag. Für den FICI ergab sich ein Wert von 1,53, der damit in diesem Fall im indifferenten Bereich lag ohne Anzeichen für explizit synergistische oder additive Effekte.

Ergebnisse

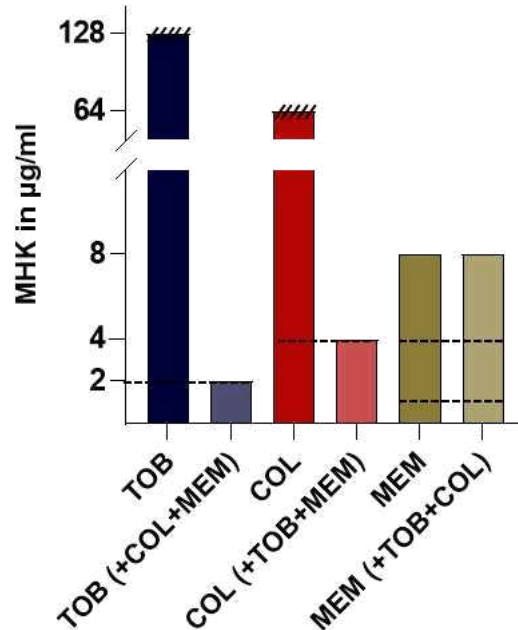


Abbildung 15: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber *A. xylosoxidans* AC 49

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der EUCAST definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Ähnlich wie im Falle des *A. xylosoxidans*-Isolates AC 27 (Abb. 14) verhält es sich auch bei Isolat AC 49 (Abb. 15). Die MHK für Tobramycin und Colistin konnte jeweils bis in den sensiblen Bereich gesenkt werden. Für Meropenem gelang erneut keine Senkung der MHK durch die Dreifachkombination, die damit weiterhin im resistenten Bereich lag. Für den FICI ergab sich mit 1,08 erneut ein Wert größer 1, der damit knapp im Bereich der Indifferenz zu verorten ist ohne Hinweis auf eindeutig additive oder synergistische Effekte.

Ergebnisse

Die übrigen getesteten Stämme von *A. xylosoxidans* zeigten ein gutes Ansprechen auf die Dreifachkombination (vgl. Tab. 16), allerdings hatten sie bereits zuvor Sensibilität gegenüber einzelnen Antibiotika der Kombination gezeigt (vgl. Tab. 13). Damit ist hier kein adäquater Vergleich zwischen der Wirksamkeit der Kombination und der einzelnen Antibiotika möglich.

3.1.3 *Burkholderia cepacia* Komplex (BCC)

I Testung einzelner Antibiotika

Als dritte Bakterienspezies untersuchten wir im Rahmen der Sensibilitätstestung mittels manueller Mikrobouillondilution Patientenisolate sowie in der Literatur beschriebene Laborstämme des BCC. Diese Bakterienspezies ist mit teilweise besonders schweren und häufig chronifizierenden respiratorischen Infektionen bei Patienten mit einer CF-Grunderkrankung assoziiert. Ein wichtiger Grund sind ausgeprägte Resistenzen gegen viele der gängigen und in der Therapie häufig eingesetzten Antibiotika, wie beispielsweise gegen Tobramycin.

Wie bei *P. aeruginosa* und *A. xylosoxidans* umfasste die Sensibilitätstestung für den BCC ebenfalls die Antibiotika Meropenem, Ceftazidim, Colistin und Tobramycin sowie zusätzlich Cotrimoxazol und Moxifloxacin. Diese wurden in einem ersten Schritt einzeln für die ausgewählten Isolate des BCC getestet (s. Tab. 17).

Ergebnisse

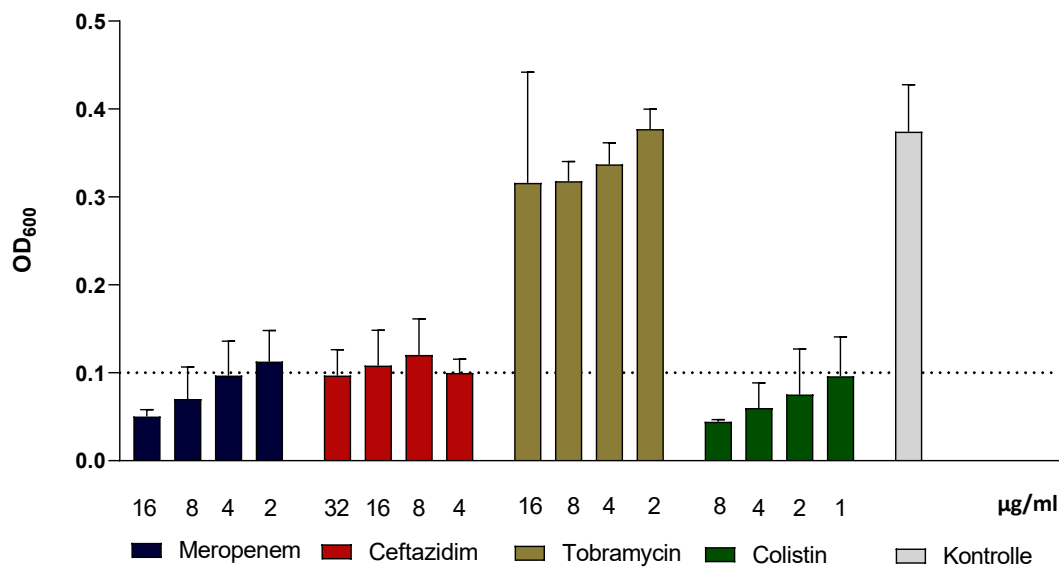


Abbildung 16: Exemplarische Wachstumsdarstellung des *BCC*-Isolates BC 3 anhand der optischen Dichte in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration

Exemplarische Darstellung der optischen Dichten (OD) bei 600nm zur Beurteilung des Bakterienwachstums am Beispiel des *BCC*-Patientenisolates BC 3 in Abhängigkeit der Konzentration des zugegebenen Antibiotikums (µg/ml). Die Kontrolle zeigt das Bakterienwachstum ohne Zugabe eines Antibiotikums. Eine OD von 0,1 stellt den Grenzwert für Wachstum dar. Das Experiment wurde in Form von 3 biologischen Replikaten, jeweils in Duplikaten durchgeführt.

Die manuelle Mikrobouillondilution wurde nach dem gleichen Schema wie bei den bisherigen Testungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Sensibilitätstestungen sind in Tab. 17 dargestellt.

Für den *BCC* gibt es keine von der EUCAST definierten Grenzwerte für Resistenz und Sensibilität, da sie bisher nicht mit der Wirksamkeit im Menschen korreliert werden können. Daher wurde hier auf die Definition der amerikanischen Gesellschaft CLSI zurückgegriffen. Da der *BCC* intrinsische Resistenz gegenüber Colistin, Tobramycin aufweist, gibt es auch hierfür keine definierten Grenzwerte. Ebenso wurden bisher in keiner Fachgesellschaft Grenzwerte für

Ergebnisse

Moxifloxacin festgelegt. Dies ist in Tabelle 17 und 18 daher mit NB für „nicht beurteilbar“ gekennzeichnet.

Tabelle 17: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme des *BCC* gegenüber Meropenem (MEM), Ceftazidim (CTZ), Colistin (COL), Tobramycin (TOB), Cotrimoxazol (COT) sowie Moxifloxacin (MOX) in µg/ml inklusive einer Beurteilung hinsichtlich der Resistenzlage auf Grundlage der aktuellen CLSI-Leitlinie [131] (Sensibilität (S), Sensibilität bei erhöhter Dosis (I), Resistenz (R), Nicht Beurteilbar (NB))

	MEM		CTZ		COL		TOB		COT		MOX	
BC 1	128	R	256	R	> 64	R	128	R	8	R	4	NB
BC 3	8	I	2	S	> 64	R	64	R	0,5	S	< 2	NB
BC 7	8	I	2	S	> 8	R	> 16	R	-	-	-	-
BC 8	128	R	128	R	> 64	R	128	R	16	R	2	NB
BC 10	-	-	8	I	> 8	R	> 16	R	1	S	< 2	NB
BC 11	-	-	< 4	S	> 8	R	> 16	R	0,5	S	< 2	NB
BC 12	-	-	< 4	S	> 8	R	> 16	R	1	S	< 2	NB
BC J2315	1,25	R	32	R	125	R	125	R	4	R	4	NB
BC ATCC	4	I	> 4	S	> 8	R	> 16	R	-	-	-	-

Wie für *P. aeruginosa* und *A. xylosoxidans* wurde auch für die Stämme des *BCC* parallel die MHK noch einmal mit einem in der Routinediagnostik bereits etablierten Testverfahren ermittelt, um sie mit den Ergebnissen der manuellen Mikrobouillondilution zu vergleichen und unsere Methode zu verifizieren. Zur Anwendung kamen in diesem Fall E-Teste in Agardiffusion, da die Stämme in den 96-well Platten von merlin und ebenfalls im Vitek-System zu langsames Wachstum für eine Messung zeigten (Tab. 18).

Ergebnisse

Tabelle 18: Darstellung der MHK der ausgewählten Stämme des *BCC* gegenüber Meropenem (MEM), Ceftazidim (CTZ), Colistin (COL), Tobramycin (TOB), Cotrimoxazol (COT) sowie Moxifloxacin (MOX) in µg/ml im Rahmen der Sensibilitätstestung mittels Agardiffusion (E-Test) inklusive einer Beurteilung hinsichtlich der Resistenzlage auf Grundlage der aktuellen CLSI-Leitlinie [131] (Sensibilität (S), Resistenz (R), Nicht Beurteilbar (NB))

	MEM		CTZ		COL		TOB		COT		MOX	
BC 1	> 256	R	> 256	R	> 64	R	> 256	R	> 32	R	> 32	NB
BC 3	1,5	S	1,5	S	> 64	R	> 256	R	0,5	S	0,75	NB
BC 7	1,5	S	1,5	S	> 64	R	> 256	R	1	S	1	NB
BC 8	> 256	R	> 256	R	> 64	R	> 256	R	> 32	R	6	NB
BC 10	2	S	2	S	> 64	R	> 256	R	1	S	3	NB
BC 11	1,5	S	1,5	S	> 64	R	> 256	R	0,38	S	0,75	NB
BC 12	2	S	2	S	> 64	R	> 256	R	0,5	S	3	NB
BC J2315	> 256	R	> 256	R	> 64	R	> 256	R	> 32	R	> 32	NB
BC ATCC	> 256	R	> 256	R	> 64	R	> 256	R	> 32	R	> 32	NB

Die Ergebnisse ließen sich trotz unterschiedlicher Testverfahren (manuelle Mikrobouillondilution gegenüber Agardiffusion) weitgehend gut vergleichen.

Die Resistenz des *BCC* gegenüber Colistin und Tobramycin konnte auch in unseren Experimenten bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass einige der Stämme, beispielsweise BC 3, BC 7 oder BC 10, allgemein ein besseres Ansprechen auf einen Großteil der verwendeten Antibiotikaklassen bereits in Einfachnutzung zeigten, während das Wachstum anderer Stämme, beispielsweise BC 1, BC 8 oder J2135, von kaum einem einzelnen Antibiotikum inhibiert werden konnte (vgl. Tab 17 + 18).

Ergebnisse

II Testung von Antibiotikakombinationen

II.1 Testung antibiotischer Zweifachkombinationen

Nach Testung der einzelnen Antibiotika erfolgte die Sensibilitätstestung von Zweifachkombinationen wie bereits für *P. aeruginosa* und *A. xylosoxidans* auch für den *BCC*. Zur Anwendung kamen erneut Tobramycin + Ceftazidim und Tobramycin + Colistin. Als weitere Kombination fügten wir Cotrimoxazol + Tobramycin zu unseren Testungen hinzu. Die Auswahl der Kombinationen erfolgte in Absprache mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik des Universitätsklinikums Tübingen.

Die Ergebnisse der Kombinationstestung sind in Tabelle 19 sowie den folgenden Abbildungen dargestellt.

Tabelle 19: Darstellung der MHK der Zweifachkombinationen Tobramycin und Ceftazidim, Tobramycin und Colistin sowie Cotrimoxazol und Tobramycin in µg/ml gegenüber den verwendeten Bakterienstämmen nach 24 h Inkubation bei 37°C. Der erste Wert der MHK gibt die benötigte Konzentration des erstgenannten Antibiotikums an, der zweite Wert der MHK die benötigte Konzentration des zweitgenannten Antibiotikums.

	TOB + CTZ	TOB + COL	COT + TOB
BC 1	64/64	> 64/64	4/16
BC 3	0,5/1	> 64/64	< 2/4
BC 7	0,5/1	> 64/64	-
BC 8	32/16	> 64/64	4/32
BCC 10	-	-	< 2/4
BCC 11	-	-	< 2/4
BCC 12	-	-	< 2/4
BC J2315	64/64	64/64	4/32
BC ATCC	< 4/4	> 4/8	-

Ergebnisse

Die Antibiotika Colistin und Tobramycin sind aufgrund natürlicher Resistenz des *BCC* einzeln in der Regel wirkungslos und erzielten auch in Kombination in unseren Experimenten keine gesteigerte Wirksamkeit gegenüber den Stämmen des *BCC* (Tab. 19).

Ansonsten zeigten sich auch für die antibiotischen Zweifachkombinationen die bereits beobachteten stammspezifischen Tendenzen. So präsentierten sich auf der einen Seite die Stämme *BC 3*, *BC 7* oder auch *BC ATCC* grundsätzlich deutlich sensibler als auf der anderen Seite *BC 1*, *BC 8* oder *BC J2315* (Tab. 19). Eine genauere Betrachtung, in wieweit sich die Wirksamkeit der Antibiotika durch deren Kombination verbessert hat und synergistische Effekte zu beobachten sind, wird im Folgenden durch den direkten Vergleich der MHK der einzelnen Antibiotika mit der MHK der Antibiotika in Kombination untersucht. Wie bereits für *P. aeruginosa* und *A. xylosoxidans* wird auch hier mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim begonnen.

Ergebnisse

Kombination Tobramycin + Ceftazidim

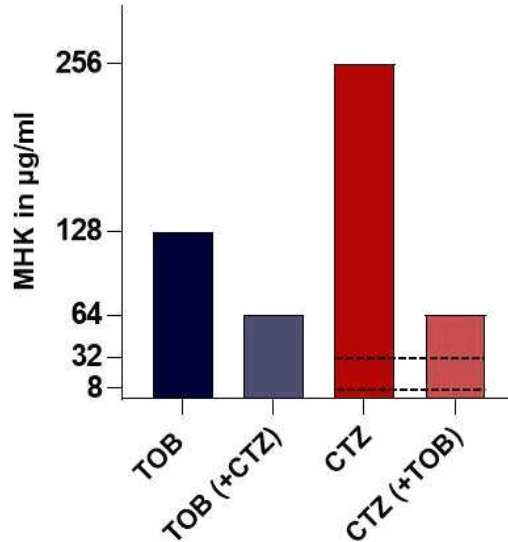


Abbildung 17: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat *BC 1*

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + CTZ. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt.

Das Isolat *BC 1* zeigte gegenüber Tobramycin und Ceftazidim in Einfachnutzung keine Sensibilität (vgl. Tab. 17 + 18). Durch Kombination der beiden Antibiotika konnte die jeweilige MHK zwar deutlich gesenkt werden, die Werte lagen jedoch weiterhin im resistenten Bereich (Abb. 17).

Für den FICI ergab sich aufgrund der ausgeprägten Reduktion der jeweiligen MHK ein Wert von 0,75, der damit im Bereich additiver Effekte liegt.

Ergebnisse

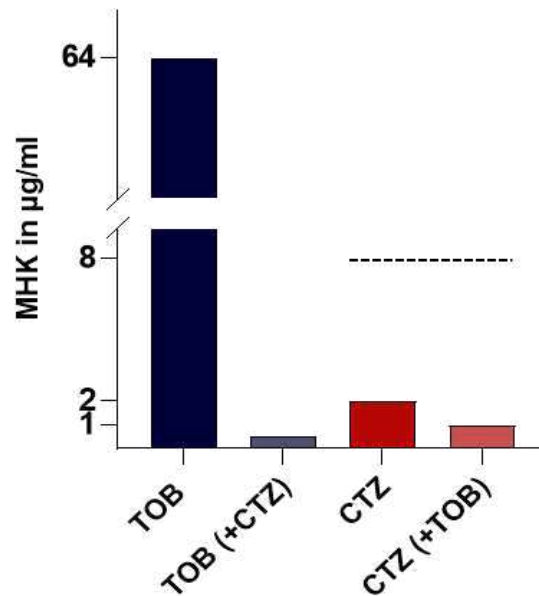


Abbildung 18: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 3

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + CTZ. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt.

Ceftazidim gegenüber zeigte das Isolat BC 3 bereits bei Einfachnutzung gute Sensibilität (vgl. Tab. 17 + 18), doch auch hier konnte die MHK durch Kombination mit Tobramycin noch einmal um die Hälfte innerhalb des sensiblen Bereiches abgesenkt werden (Abb. 16). Die MHK für Tobramycin konnte durch die Kombination mit Ceftazidim noch deutlicher um ein Vielfaches verringert werden (vgl. Tab. 17 + 18 sowie Abb. 18). Bei Berechnung des FICI ergab sich ein Wert von 0,51, der damit knapp außerhalb der Synergie liegt, allerdings klar im Bereich ausgeprägter additiver Effekte.

Ergebnisse

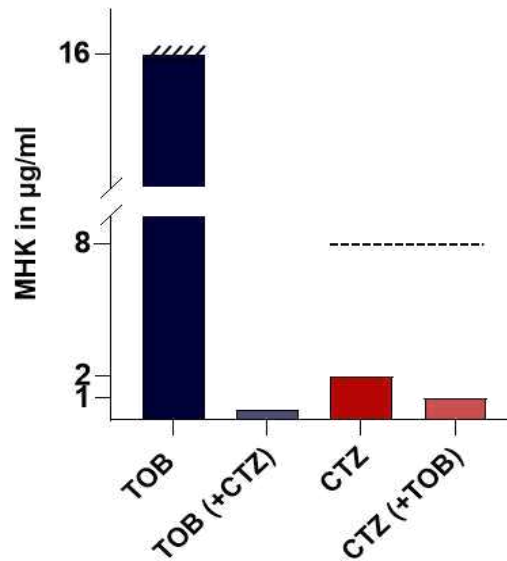


Abbildung 19: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat *BC 7*

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + CTZ. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Im Falle von nur einer Linie entspricht der Grenzwert für Sensibilität dem für Resistenz. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Für das Isolat *BC 7* zeigte sich in unseren Experimenten ein sehr ähnliches Bild wie bereits zuvor für das Isolat *BC 3* (Abb. 18). Die MHK für Tobramycin konnte erneut um ein Vielfaches gesenkt werden und auch für Ceftazidim konnte die MHK innerhalb des sensiblen Bereiches noch einmal um die Hälfte reduziert werden (Abb. 19). Daraus ergab sich ein Wert für den FICI von $\leq 0,53$, der damit ebenfalls knapp außerhalb expliziter Synergie liegt, allerdings im Bereich ausgeprägter additiver Effekte.

Ergebnisse

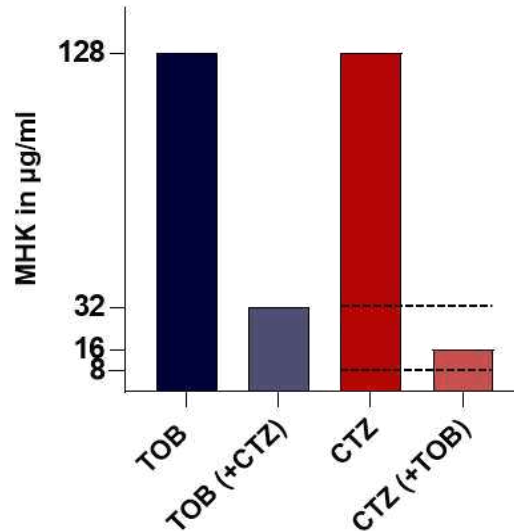


Abbildung 20: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Ceftazidim einzeln mit der Kombination Tobramycin + Ceftazidim gegenüber dem Isolat BC 8

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und CTZ einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + CTZ. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt.

Durch die Kombination konnte die MHK auch für das Isolat BC 8 sowohl für Tobramycin als auch Ceftazidim deutlich gesenkt werden. Für Tobramycin lässt sich auch hier aufgrund fehlender Grenzwerte keine eindeutige Aussage hinsichtlich Sensibilität treffen. Die MHK für Ceftazidim konnte allerdings in Kombination mit Tobramycin bis in den Bereich der Sensibilität bei erhöhter Dosis gesenkt werden, der *per definitionem* bereits als Sensibilität gilt. Für den FICI ergab sich ein Wert von 0,37, der damit eindeutig als Synergie zu werten ist.

In den folgenden Abbildungen wird nun genauer auf die Ergebnisse der Sensibilitätstestung für die Kombination Tobramycin und Colistin eingegangen.

Ergebnisse

Kombination Tobramycin + Colistin

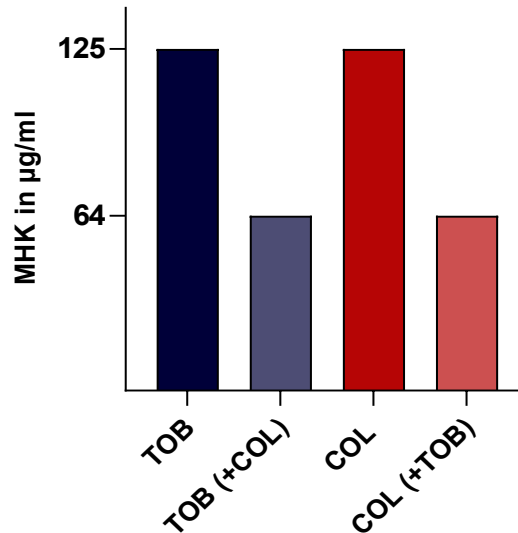


Abbildung 21: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin und Colistin einzeln mit der Kombination Tobramycin + Colistin gegenüber dem Isolat BC J2315

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB und COL einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL.

Aufgrund fehlender Grenzwerte konnten für die Kombination Tobramycin und Colistin für den *BCC* keine Sensibilitätsbereiche angegeben werden. Für das Isolat BC J2315 (Abb. 21) konnte die MHK sowohl für Tobramycin als auch Colistin durch Kombination um etwa die Hälfte im Vergleich zum Ausgangswert der einzelnen Antibiotika gesenkt werden (vgl. Tab. 17 + 18). Allerdings sind auch diese MHK nach wie vor auf einem sehr hohen Niveau. Daher ist hier nicht von einer Effektivität der Kombination gegenüber dem BC J2315 auszugehen. Der Wert des FICI liegt geringfügig über 1 und damit an der Grenze zu einem additiven Effekt.

Auch für die übrigen Isolate des *BCC* lassen die Ergebnisse der Kombinationstestung nicht auf eine gesteigerte antibiotische Wirksamkeit durch die Kombination Tobramycin + Colistin im Vergleich zu den einzelnen Antibiotika schließen bei durchweg hohen Werten für die MHK (vgl. Tab. 17 + 19).

Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt wird die Wirkung der Zweifachkombination Cotrimoxazol und Tobramycin genauer untersucht. Auch hier existieren für die beiden Antibiotika weder von EUCAST noch CLSI definierte Grenzwerte für Sensibilität und Resistenz.

Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin

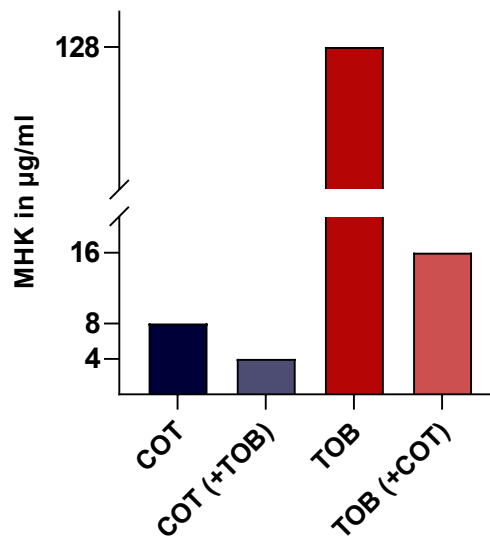


Abbildung 22: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat BC 1

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für COT und TOB einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination COT + TOB.

Durch Kombination von Cotrimoxazol und Tobramycin konnte die MHK für jedes der Antibiotika gegenüber dem einzelnen Antibiotikum klar gesenkt werden. Das Isolat BC 1 zeigte bereits gegenüber Cotrimoxazol alleine ein gutes Ansprechen, durch die Kombination mit Tobramycin konnte die MHK aber noch einmal um die Hälfte gesenkt werden (Abb. 22).

Ergebnisse

Tobramycin zeigte dagegen einzeln gegenüber dem Isolat *BC 1* keine antibiotische Wirkung, durch Kombination mit Cotrimoxazol konnte allerdings die MHK für Tobramycin um ein Vielfaches gesenkt werden (Abb. 22).

Mit einem FICI von 0,625 liegt die Wirkung im Bereich ausgeprägter additiver Effekte.

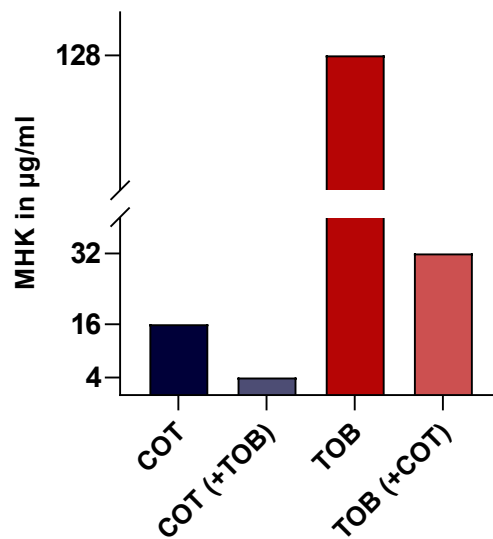


Abbildung 23: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat *BC 8*

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für COT und TOB einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus COT + TOB.

Für Isolat *BC 8* (Abb. 23) zeigte sich in unseren Experimenten ein ähnliches Ansprechverhalten wie für das Isolat *BC 1* zuvor (Abb. 22). Für Isolat *BC 8* konnte durch Kombination von Cotrimoxazol und Tobramycin die MHK im Vergleich zur MHK beider einzelnen Antibiotika jeweils um das Vierfache gesenkt werden. Auch hier lässt sich aufgrund fehlender Grenzwerte keine adäquate Einordnung bezüglich Sensitivität und Resistenz vornehmen.

Ergebnisse

Mit einem FICI von 0,5 kann hinsichtlich *BC 8* von synergistischen Effekten der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gesprochen werden.

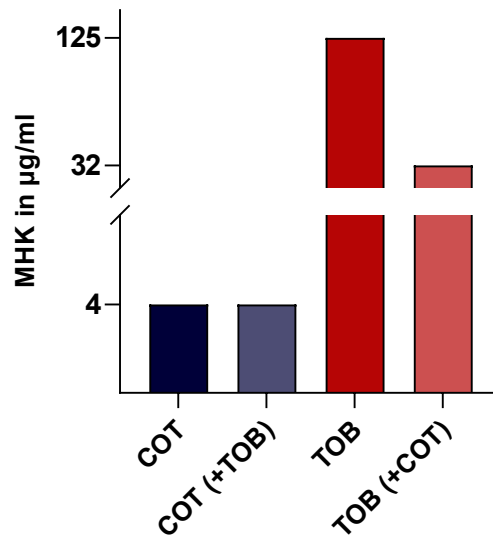


Abbildung 24: Vergleich der Wirksamkeit von Cotrimoxazol und Tobramycin einzeln mit der Kombination Cotrimoxazol + Tobramycin gegenüber dem Isolat

BC J2315

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für COT und TOB einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus COT + TOB.

BC J2315 zeigte in unseren Experimenten bereits auf Cotrimoxazol einzeln ein gutes Ansprechen, durch Kombination mit Tobramycin konnte die MHK nicht weiter gesenkt werden (Abb. 24). Hinsichtlich Tobramycin ist wie für *BC 1* und *BC 8* zuvor (vgl. Abb. 22 + 23) eine Reduktion der MHK auf ein Viertel zu verzeichnen. Für den FICI ergibt sich ein Wert größer 1 und die Wirkung der Kombination liegt damit in diesem Fall außerhalb synergistischer oder additiver Effekte.

Ergebnisse

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte die Kombination Cotrimoxazol und Tobramycin in unseren Experimenten insgesamt eine gute Wirksamkeit gegenüber den von uns getesteten Isolaten des *BCC* (vgl. Tab. 19). Zudem ließen sich additive bzw. synergistische Effekte der Kombination beobachten (vgl. Abb. 22 +23). Einzig eine Beurteilung hinsichtlich Resistenz und Sensibilität ist aufgrund fehlender Grenzwerte von EUCAST und CLSI nur eingeschränkt möglich.

II.2 Testung von Dreifachkombinationen

Neben den bereits beschriebenen Zweifachkombinationen testeten wir in unseren Experimenten die Dreifachkombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem auch für einige Isolate des *BCC*. Zudem untersuchten wir die Dreifachkombination aus Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin. Unser Ziel bestand in dem Vergleich der Zweifachkombinationen mit den Dreifachkombinationen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und möglicher Veränderungen in der Ausprägung additiver oder synergistischer Effekte durch Hinzunahme eines dritten Antibiotikums. Die Auswahl der Kombinationen erfolgte ebenfalls in Absprache mit der CF Ambulanz der Kinderklinik Tübingen des UKT.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 20: Darstellung der MHK für ausgewählte Isolate des *BCC* gegenüber den Dreifachkombinationen Tobramycin + Colistin + Meropenem (TOB, COL, MER) sowie Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin (MOX, CTZ, COL) in µg/ml nach 24 h Inkubation bei 37°C.

	TOB + COL + MER	MOX + CTZ + COL
BC 1	2/8/16	2,5/8/2
BC 3	2/4/8	< 5/16/4
BC 7	< 4/2/8	
BC 8	2/8/8	1,25/4/2
BC 10	-	< 5/16/4
BC 11	-	< 5/16/4
BC 12	-	< 5/16/4
BC J2315	16/16/32	< 5/16/4
BC ATCC	< 4/2/8	-

In unseren Experimenten konnte das Wachstum aller untersuchten Isolate des *BCC* durch beide Dreifachkombinationen unterbunden werden. In wieweit sich die Wirkung durch Hinzunahme eines dritten Antibiotikums im Vergleich zu Einfachnutzung oder den zuvor getesteten Zweifachkombinationen verändert, wird in den folgenden Abbildungen sowie Tabelle 20 dargestellt.

Der folgende Abschnitt beginnt mit den Ergebnissen für die Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem. Graphisch dargestellt sind auch hier nur die Ergebnisse, die einen aussagekräftigen Vergleich und eine Beurteilung hinsichtlich Synergie und additiven Effekten zulassen.

Ergebnisse

Dreifachkombination Tobramycin + Colistin + Meropenem

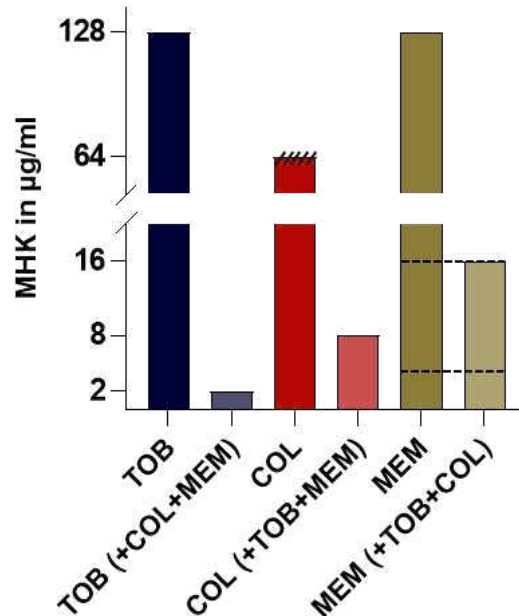


Abbildung 25: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat BC 1

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze bedeutet, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Hinsichtlich Isolat BC 1 konnte in unseren Experimenten durch die Kombination Tobramycin + Colistin + Meropenem die MHK für jedes der Antibiotika eindeutig und jeweils um ein Vielfaches des Ausgangswertes des einzelnen Antibiotikums gesenkt werden (Abb. 25). Für Meropenem konnte durch die Kombination der Bereich der Sensibilität bei erhöhter Dosis erreicht werden. Da für Tobramycin und Colistin keine Grenzwerte des sensiblen und resistenten Bereiches für den

Ergebnisse

BCC existieren, konnte für BC 1 sowie den übrigen Isolaten des *BCC* keine abschließende Beurteilung hinsichtlich Sensibilität und Resistenz erfolgen.

Für den FICI ergab sich daraus ein Wert von kleiner 0,27, der damit deutlich im Bereich synergistischer Wirkungen liegt.

Ergebnisse

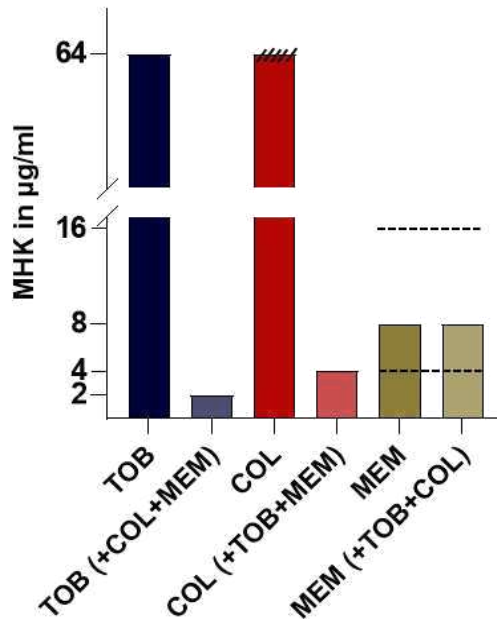


Abbildung 26: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat BC 3

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze bedeutet, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Für das Isolat BC 3 konnte die MHK sowohl für Tobramycin als auch Colistin durch Kombination um ein Vielfaches gesenkt werden (Abb. 26). Die MHK für Meropenem hingegen lag auch einzeln bereits im Bereich der Sensibilität erhöhter Dosis und konnte auch durch eine Kombination der Antibiotika nicht weiter gesenkt werden. Dadurch ergaben sich Werte für den FICI von größer 1 ohne Nachweis explizit synergistischer oder additiver Effekte.

Ergebnisse

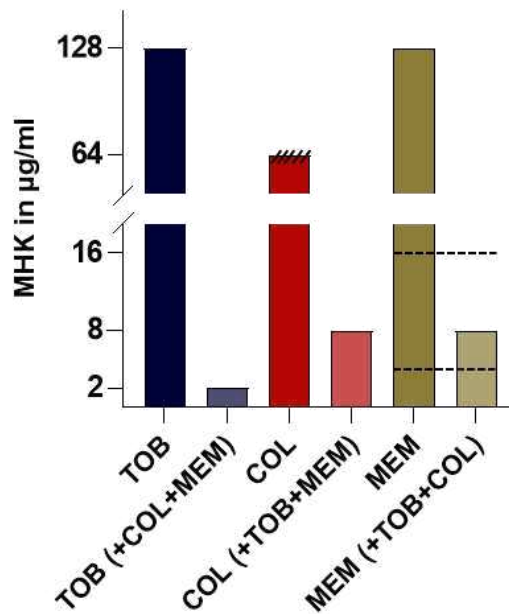


Abbildung 27: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat BC 8

Gezeigt ist die MHK in $\mu\text{g/ml}$ für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelten Linien (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität (untere Linie) und Resistenz (obere Linie) angezeigt. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze bedeutet, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Im Falle von *BC 8* konnte die MHK für jedes Antibiotikum durch ihre Kombination im Vergleich zur Einzelnutzung um ein Vielfaches gesenkt werden (Abb. 27). Die MHK für Meropenem konnte durch Kombination mit Tobramycin und Colistin deutlich gesenkt werden bis in den Bereich der Sensibilität bei erhöhter Dosis. Für Tobramycin und Colistin lässt sich aufgrund fehlender Grenzwerte keine Einordnung hinsichtlich des sensiblen Bereiches vornehmen. Der FICI von kleiner 0,2 zeigt in diesem Fall klar synergistische Wirkung der drei Antibiotika an.

Ergebnisse

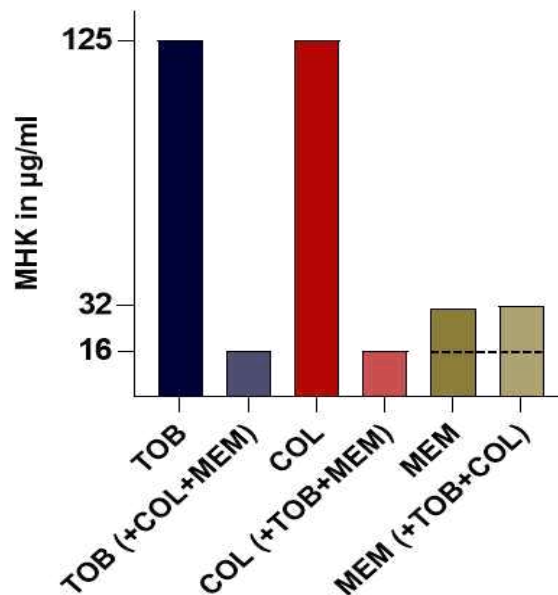


Abbildung 28: Vergleich der Wirksamkeit von Tobramycin, Colistin und Meropenem einzeln mit der Kombination aus Tobramycin + Colistin + Meropenem gegenüber dem Isolat *BC J2315*

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Die gestrichelte Linie (-----) zeigt den von der CLSI definierte Grenzwert für Sensibilität an.

Im Falle von Isolat *BC J2315* zeigte sich in unseren Experimenten eine weit weniger eindeutige Wirkung der Dreifachkombination (Abb. 28) im Vergleich zu den Isolaten *BC 1* bzw. *BC 8* (vgl. Abb. 25 und 27). Während die MHK für Tobramycin und Colistin erneut um ein Vielfaches und klar gesenkt werden konnte, blieb die MHK für Meropenem auch nach Kombination unverändert außerhalb des sensiblen Bereiches. Auch der FICI von größer 1 zeigte keine eindeutig additive oder synergistische Wirkung an.

Ergebnisse

In den folgenden Graphiken werden nun die Ergebnisse unserer Experimente für die zweite Dreifachkombination Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin dargestellt. Auch hier erfolgt die Darstellung anhand von zwei Beispielen, bei denen aufgrund eindeutiger Werte ein aussagekräftiger Vergleich mit der MHK der einzelnen Antibiotika möglich ist sowie eine Beurteilung hinsichtlich synergistischer Effekte.

Dreifachkombination Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin

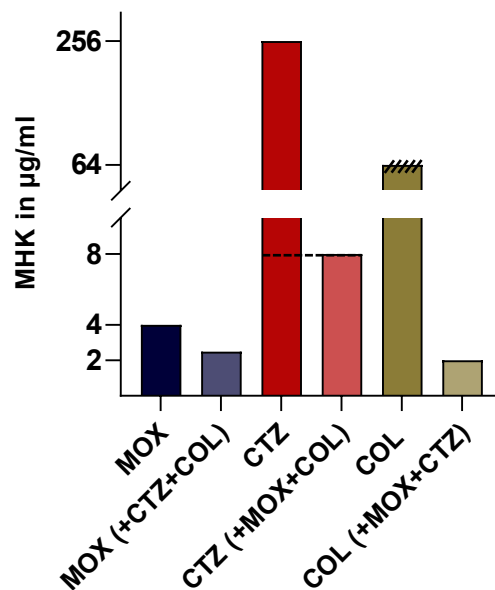


Abbildung 29: Vergleich der Wirksamkeit von Moxifloxacin, Ceftazidim und Colistin einzeln mit der Kombination aus Meropenem + Ceftazidim + Colistin gegenüber dem Isolat BC 1

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelte Linie (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität gekennzeichnet. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Ergebnisse

Durch die Kombination von Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin konnte in unseren Experimenten gegenüber dem Isolat *BC 1* eine eindeutige Reduktion der MHK für jedes Antibiotikum erreicht werden im Vergleich zu der MHK bei Einfachnutzung (Abb. 29). Für Moxifloxacin, das bereits bei Einfachnutzung gute Wirkung gegen die von uns getesteten Isolate des *BCC* gezeigt hatte (vgl. Tab. 17), konnte die MHK durch Kombination mit Colistin und Ceftazidim für Isolat *BC 1* noch einmal um die Hälfte gesenkt werden. Colistin hatte bei alleiniger Verwendung keinerlei antibiotische Wirkung gegenüber allen von uns verwendeten Isolaten des *BCC* gezeigt (vgl. Tab. 17). Durch Kombination konnte die MHK für Moxifloxacin gegenüber Isolat *BC 1* gegenüber um ein Vielfaches gesenkt werden. Da für Moxifloxacin und Colistin keine eindeutig definierten Grenzwerte für den sensiblen Bereich existieren, kann hier diesbezüglich keine abschließende Beurteilung erfolgen. Ceftazidim hatte in unseren Experimenten keine Einzelwirkung gegenüber *BC 1* gezeigt, nach Kombination mit Moxifloxacin und Colistin lag die MHK nun im sensiblen Bereich (Abb. 29). Der FICI von 0,7 zeigt zumindest eindeutig additive Effekte an.

Ergebnisse

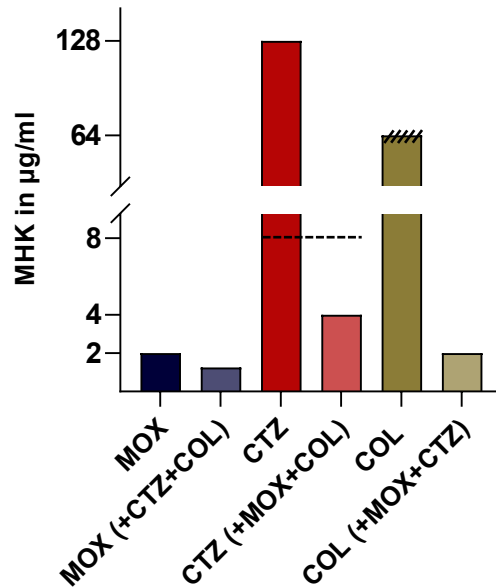


Abbildung 30: Vergleich der Wirksamkeit von Moxifloxacin, Ceftazidim und Colistin einzeln mit der Kombination aus Meropenem + Ceftazidim + Colistin gegenüber dem Isolat *BC 8*

Gezeigt ist die MHK in µg/ml für TOB, COL und MEM einzeln im direkten Vergleich mit der MHK für das gleiche Antibiotikum in der Kombination aus TOB + COL + MEM. Durch die gestrichelte Linie (-----) werden die von der CLSI definierten Grenzwerte für Sensibilität gekennzeichnet. Eine Schraffur der oberen Balkengrenze zeigt an, dass keine eindeutige Obergrenze ermittelt werden konnte, der tatsächliche Wert für die MHK also noch einmal darüber liegt.

Für das Isolat *BC 8* (Abb. 30) zeigten sich in unseren Experimenten sehr ähnliche Ergebnisse wie zuvor für *BC 1*. Obwohl bereits in Einfachnutzung gut wirksam, konnte die MHK für Moxifloxacin durch Kombination noch einmal deutlich gesenkt werden. Erneut noch weitaus deutlicher fiel die Reduktion für Ceftazidim sowie Colistin aus. Ohne antibiotische Wirkung in Einzelnutzung konnte die MHK in Kombination um ein Vielfaches gesenkt werden, im Falle von Ceftazidim bis deutlich in den sensiblen Bereich. Die Berechnung des FICI ergab mit 0,5 einen Wert im Bereich explizit synergistischer Effekte.

Ergebnisse

3.1.4 Zusammenfassung Fractional Inhibitory Concentration Index

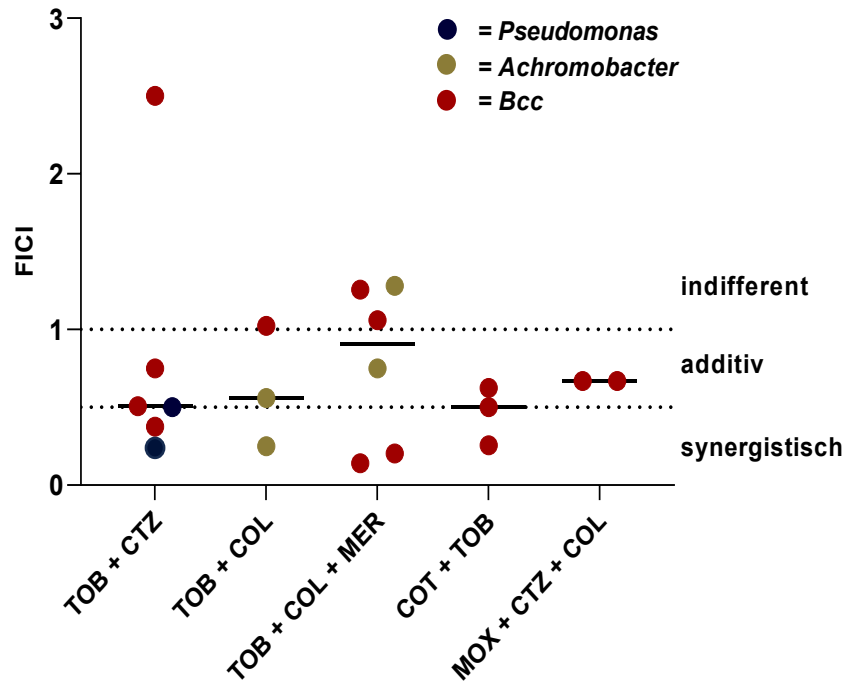


Abbildung 31: Darstellung der errechneten FICI-Werte sortiert nach Bakterienspezies sowie Antibiotikakombination

Darstellung der errechneten FICI-Werte mit farblicher Markierung der Bakterienspezies *P. aeruginosa* (blau), *A. xylosoxidans* (gold) sowie *BCC* (rot), gruppiert nach untersuchter Antibiotikakombination. Durch die gestrichelten Linien werden die jeweiligen FICI-Bereiche gekennzeichnet mit Abgrenzung synergistischer, additiver sowie indifferenten Effekte. Zudem wird als durchgezogene Linie der jeweilige Median der FICI-Werte dargestellt.

Ergebnisse

Abbildung 31 stellt in einer Übersicht vergleichend die errechneten FICI-Werte sortiert nach jeweiliger Antibiotikakombination sowie Bakterienspezies dar. Im Rahmen unserer Experimente konnten für alle von uns untersuchten Antibiotikakombinationen additive bzw. in einigen Fällen sogar explizit synergistische Wirkungen gezeigt werden. Der Median der FICI-Werte lag dabei für jede der Kombinationen mindestens im Bereich additiver Effekte, für die Zweifachkombinationen Tobramycin + Ceftazidim sowie Cotrimoxazol + Tobramycin an der Grenze zur Synergie. Diese Wirkungseffekte präsentierten sich jedoch hoch stammspezifisch und selbst innerhalb der gleichen Bakterienspezies sehr variabel mit einer breiten Streuung der errechneten FICI-Werte. Eine vergleichende Gegenüberstellung und Bewertung der unterschiedlichen Antibiotikakombinationen finden sich in der abschließenden Diskussion.

4 Diskussion

Im Rahmen der Multisystemerkrankung CF stellen nach wie vor chronische und schwer zu therapierende respiratorische Infektionen sowohl Patient*innen als auch das interdisziplinär behandelnde Team vor immense Herausforderungen. Häufig bilden sie den die Prognose bestimmenden und letztendlich limitierenden Faktor [19, 124]. Eine besondere Rolle kommt dabei den Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* sowie Vertretern des BCC zu, die häufig zu chronischen und komplikationsreichen respiratorischen Infektionen führen [23, 59, 61, 132]. Trotz mittlerweile großer Fortschritte in der Therapie der CF, wie beispielsweise durch den Einsatz von CFTR-Modulatoren, die Lebensqualität und Prognose vieler Patient*innen deutlich steigern konnten, stellt die intensive antibiotische Therapie respiratorischer Infektionen nach wie vor eine zentrale und nicht verzichtbare therapeutische Säule dar [133, 134]. Häufig kommen Kombinationen verschiedener Antibiotika zum Einsatz, für deren Effektivität und Nutzen allerdings in vielen Fällen eine systematische Evidenz fehlt und für die daher dringender weiterer Untersuchungsbedarf besteht [116, 135]. Die Notwendigkeit derartiger Untersuchungen wird dadurch unterstrichen, dass eine antibiotische Kombinationstestung *in vitro* an bakteriellen Patientenisolaten im Rahmen der CF wie auch in der übrigen mikrobiologischen Diagnostik bisher nur selten in der Routine durchgeführt wird [136].

Diese Arbeit untersucht verschiedene Antibiotikakombinationen *in vitro* hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber Stämmen der drei oben genannten Bakterienspezies mittels manueller Mikrobouillondilution. Unser Ziel war es, eine Methodik zu etablieren, mit deren Hilfe in Zukunft routinemäßig eine antibiotische Kombinationstestung der von CF-Patienten isolierten pathogenen Keime durchgeführt werden kann. Im Zuge dessen korrelierten wir die Methodik der Mikrobouillondilution mit weiteren in der mikrobiologischen Diagnostik etablierten Verfahren hinsichtlich der Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse. Zudem wurde die antibiotische Effektivität der Kombinationen gegenüber den von uns verwendeten Bakterienstämmen untersucht sowie eine Beurteilung hinsichtlich möglicher additiver und synergistischer Effekte vorgenommen.

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in unseren *in vitro* Experimenten eine gute Wirksamkeit der von uns untersuchten antibiotischen Kombinationen gezeigt werden mit dem mehrmaligen Nachweis additiver bis hin zu synergistischen Effekten. Gleichzeitig präsentierte sich die Effektivität der Antibiotikakombinationen und insbesondere ein beobachteter antibiotischer Synergismus in unseren Experimenten als hoch stammspezifisch. Die Ergebnisse ließen sich nicht auf eine gesamte Bakterienspezies übertragen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse unserer Arbeit im Hinblick auf diese und weitere Aspekte diskutiert.

4.1 Wahl der geeigneten Methodik

Aufgrund der besonderen Wachstumscharakteristika, insbesondere von *P. aeruginosa*, wird immer wieder diskutiert, ob und in welcher Weise die Bedingungen *in vitro* den tatsächlichen Wachstumsbedingungen und dem *in vivo* Milieu in den Lungen von CF-Patient*innen entsprechen und inwieweit sie bei der Resistenztestung angepasst werden sollten bzw. können.

Neben der Ausbildung von Biofilmen ist in diesem Kontext auch das Wachstum unter teils anaeroben Bedingungen ein wichtiger Aspekt [137, 138]. Beide Eigenschaften werden in konventionellen Empfindlichkeitstestungen nicht berücksichtigt. Zudem zeigte sich, dass die Empfindlichkeit gegenüber einem Antibiotikum nicht nur zwischen unterschiedlichen Stämmen von *P. aeruginosa* variieren kann, sondern ebenso zwischen unterschiedlichen Kolonien desselben Stammes [139].

Besonders die Relevanz einer Empfindlichkeitstestung unter Wachstum in Form von Biofilmen wird immer wieder diskutiert und untersucht. Man erhofft sich eine bessere Korrelation der Ergebnisse *in vitro* mit dem tatsächlichen klinischen Outcome und Ansprechen. Insbesondere bei *P. aeruginosa* stellt sich die schlechte Vorhersagbarkeit des klinischen Effektes der Antibiotikatherapie im Rahmen von CF als großes Problem dar [140]. Studien mit Anwendung unterschiedlicher Assays und Panels (bspw. dem Calgary Biofilm Device), die

das Wachstum in Biofilmen und die nachfolgende Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen ermöglichen, konnten eine deutliche Erhöhung der benötigten Antibiotikakonzentrationen zeigen verglichen mit einer herkömmlichen Sensibilitätstestung außerhalb von Biofilmen [141, 142].

Allerdings konnte weder eine eindeutige Verbesserung der Korrelation der in dieser Form gewonnenen Ergebnisse mit dem späteren klinischen Ansprechen nachgewiesen werden, noch wurde ein signifikant besseres Patientenoutcome erreicht [138]. Daher führten wir auch in dieser Arbeit entsprechend der aktuellen Leitlinie zu Lungenerkrankung bei Mukoviszidose die Sensibilitätstestungen unter Verwendung herkömmlicher Nährmedien und Methoden durch [135].

4.2 Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei Anwendung unterschiedlicher Verfahren zur Sensibilitätstestung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse bei Anwendung der manuellen Mikrobouillondilution hinsichtlich *A. xylosoxidans* sowie dem BCC insgesamt gut mit den Ergebnissen aus anderen mikrobiologischen Routineverfahren korrelierten wie der Testung mittels Agardiffusion (E-Test), der automatisierten Empfindlichkeitsprüfung mittels VITEK oder MRGN-Screeningplatten (vgl. Tab. 15 und 19).

Auch für weitere Bakterienspezies, beispielsweise unterschiedlichen Subspezies der Staphylokokken, Streptokokken sowie Enterokokken, konnte bereits eine gute Vergleichbarkeit der mit der Methodik der Mikrobouillondilution gewonnenen Ergebnisse mit denen mittels beispielsweise der Agardiffusion erhaltenen gezeigt werden [143].

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der *in vitro* Sensibilitätstestung für die Isolate von *P. aeruginosa* unterschieden sich dagegen deutlich in Abhängigkeit von den angewandten Methoden entweder der Mikrobouillondilution oder der Agardiffusion (vgl. Tab. 10 + 11). Bereits zwischen den beiden Routineverfahren (E-Test gegenüber MRGN-Screeningplatten, Tab. 11) sind kleinere Schwankungen zu beobachten, beispielweise bei Testung von Meropenem

Diskussion

gegenüber *P. aeruginosa* NF 21470 oder auch bei Ceftazidim gegenüber *P. aeruginosa* NF 26144. In beiden Fällen führten die Abweichungen der MHK zu einem Klassenwechsel in der Beurteilung hinsichtlich Sensibilität (S), Sensibilität bei erhöhter Dosis (I) und Resistenz (R) (S gegenüber I sowie I gegenüber R). Im direkten Vergleich mit unseren Ergebnissen der manuellen Mikrobouillondilution zeigen sich ebenfalls Abweichungen. So differiert die Beurteilung bei Tobramycin gegenüber *P. aeruginosa* NF 26144 um ganze 2 Stufen (R gegenüber S) zwischen Agardiffusion und manueller Mikrobouillondilution sowie für Meropenem und Ceftazidim in jeweils 2 Fällen um 1 Stufe.

Dabei handelt es sich um ein Phänomen, das für *P. aeruginosa*-Isolate im Rahmen von CF bekannt und bezeichnend ist. Die Ausbildung von Biofilmen und die Entwicklung einer sogenannten mukoiden Wachstumsform der Isolate als Folge und Ausdruck ihrer Anpassung, gehen häufig mit einer Verlangsamung des Wachstums einher. Dies kann zu Variabilität in den Ergebnissen der Resistenztestung im Rahmen von Routineverfahren wie der Mikrobouillondilution führen und erschwert die Vorhersagbarkeit klinischer Effektivität [144-146].

4.3 Fehlende Grenzwerte erschweren die Vorhersagbarkeit klinischer Effektivität

Ein weiteres wichtiges Problem der Antibiotikatherapie im Rahmen der CF stellen fehlende Grenzwerte für die Sensibilitätstestung dar. Während sowohl für *P. aeruginosa* als auch für *A. xylosoxidans* von der EUCAST bzw. CLSI überwiegend Grenzwerte für die einzelnen Antibiotika definiert wurden, fehlen diese weitestgehend bis auf einige wenige Ausnahmen für den *BCC* [132, 147]. Grund hierfür sind die besonderen Herausforderungen, die der *BCC* hinsichtlich früher Identifikation und anschließend verlässlicher Sensibilitätstestung mit sich bringt [132]. Bereits die korrekte Identifikation der genauen Spezies des *BCC* ist aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft häufig schwierig und mit Fehleranfälligkeit der in der Routine eingesetzten Systeme verbunden [147-149]. Bei gleichzeitig hoher phänotypischer Varianz der unterschiedlichen *BCC*-

Diskussion

Spezies hat dies relevante Folgen für die Diagnostik sowie für die klinische Therapie [132, 150]. Die hohe Diversität der einzelnen Spezies kommt unter anderem in einem sehr heterogenen Ansprechen auf Antibiotika zum Ausdruck, die die Definition einheitlicher Grenzwerte weiter erschwert [132, 151]. Diese ausgeprägte phänotypische Varianz lässt sich gut korrelieren mit der in unseren Experimenten gezeigten Stammspezifität der Ergebnisse. Hinzu kommt, dass bei einigen Standardmethoden zur Sensibilitätstestung wie der Agardiffusion mittels Antibiotikaplättchen eine geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich des *BCC* bereits beschrieben wurde [147]. Ausschlaggebend für das weitgehende Fehlen einheitlich definierter Grenzwerte sind außerdem ein Mangel an aussagekräftigen Studien sowie insbesondere eine schlechte Korrelation von *in vitro* gewonnenen Ergebnissen mit dem späteren klinischen Ansprechen [132, 147, 152].

Besonders im Rahmen der CF-Therapie, die häufig antibiotische Kombinationen beinhaltet, stellt der Mangel an Grenzwerten für die Sensibilitätstestung daher ein großes Problem dar. Nicht nur wird die Effektivität des klinischen Ansprechens gemindert, sondern es erhöht sich gleichzeitig die Gefahr, durch insuffiziente antibiotische Therapie die Entstehung weiterer Resistenzen und die Selektion hochresistenter Stämme zu fördern [132, 153]. Bisher liegen leider weder von der EUCAST noch der CLSI definierte Grenzwerte für antibiotische Kombinationen bei CF vor. Daher hoffen wir, mit den Ergebnissen dieser Arbeit einerseits sowie ihrer Überprüfung in der klinischen Anwendung andererseits zur Schließung dieser relevanten Lücke einen wichtigen Beitrag leisten zu können.

Zudem stellt sich die Frage, wie diese Grenzwerte anschließend im Hinblick auf die unterschiedlichen Applikationsformen der Antibiotika angewandt werden. Während viele Antibiotika weiterhin systemisch verabreicht werden müssen, besteht schon seit Längerem beispielsweise für Colistin und Tobramycin die Möglichkeit einer inhalativen und damit topischen Verabreichung. Damit können bei geringerer systemischer Nebenwirkung lokal deutlich höhere Konzentrationen und damit unter Umständen auch ein Ansprechen eigentlich resistenterer Stämme erreicht werden [104]. Eine Verbesserung von Lungenfunktion und Körpergewicht konnten bei gleichzeitiger Reduktion von

Diskussion

Exazerbationen unter inhalativer antibiotischer Therapie gezeigt werden [104, 154].

Grundsätzlich stellt sich die Frage, in wieweit eine gleichmäßige Verteilung und damit eine ausreichende Wirkdosis im gesamten Respirationstrakt bis in die kleinsten Bronchioli des Patienten gewährleistet werden kann. Lokal insuffiziente Konzentrationen könnten möglicherweise zum oben genannten Problem der Entwicklung und Selektion noch resistenterer Stämme beitragen und somit die antibiotischen Therapieoptionen weiter limitieren. Immerhin misslingt eine Eradikation von beispielsweise *P. aeruginosa* trotz inhalativer Antibiotikatherapie in 10-40% der Fälle [104, 155].

Gleichzeitig konnte bisher keine signifikante Zunahme bakterieller Resistenzen unter inhalativer Antibiotikatherapie gezeigt werden [104, 156, 157].

4.4 Antibiotische Kombinationen bilden einen Grundpfeiler der CF-Therapie

Frühzeitige und intensive Antibiose bildet eine wichtige Säule der Therapie respiratorischer Infektionen im Rahmen der CF. Die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Pharmaka hinkt der Entstehung antimikrobieller Resistenzen hinterher und multiresistente Erreger wie *P. aeruginosa* stellen nicht nur im Rahmen der CF-Therapie ein immer weiter zunehmendes Problem dar [158, 159].

Häufig finden daher in der Therapie bakterieller Infektionen Kombinationen verschiedener Antibiotika Anwendung. Mögliche Vorteile, aber auch Risiken einer antibiotischen Kombinationstherapie werden immer wieder kontrovers diskutiert mit oftmals widersprüchlichen Ergebnissen [159]. So zeigten beispielsweise Studien zur Behandlung schwerer bakterieller Infektionen und des septischen Schocks Vorteile einer kombinierten Antibiotikaaanwendung verglichen zur Monotherapie [160]. Weitere Studien konnten im Rahmen einer Bakteriämie mit *P. aeruginosa* eine verringerte Mortalität unter Therapie mit

Diskussion

antibiotischen Kombinationen darlegen [161]. Befürworter des Kombinationskonzeptes erhoffen sich vielfältige positive Effekte. So soll durch die gleichzeitige Anwendung unterschiedlicher Antibiotika unter Anderem nicht nur das antimikrobielle Wirkspektrum erweitert und synergistische Effekte erreicht werden, sondern zugleich der Entstehung neuer bakterieller Resistenzen vorgebeugt werden [159].

Andere Studien konnten derartig positive Effekte einer antibiotischen Kombinationstherapie nicht bestätigen, sondern warnen vielmehr vor einem Anstieg unerwünschter Arzneimittelwirkungen ohne Reduktion der Patientenmortalität unter antibiotischer Kombinationstherapie wie beispielsweise bei der bakteriellen Sepsis [162]. Neben erhöhter Nephro- und Ototoxizität steigt die Gefahr bakterieller Superinfektionen, beispielsweise mit *Clostridioides difficile*, sowie das Risiko der Selektion und Förderung weiterer Resistenzbildung [162, 163]. Es ist jedoch wichtig, in diesem Zusammenhang die eingeschränkte Vergleichbarkeit dieser Studien zu betonen, da sich entscheidende Parameter wie die Charakteristika des Patientenkollektivs, das Erregerspektrum sowie Zeitpunkt der antibiotischen Behandlung teils deutlich unterscheiden und diese aber gleichzeitig Prognose und Therapieverlauf maßgeblich beeinflussen [159, 164].

Im Rahmen der CF stellen bakterielle respiratorische Infektionen häufig den die Prognose limitierenden Faktor dar, weswegen insbesondere hier eine effektive und frühzeitige antibiotische Therapie von zentraler Bedeutung ist [19]. Im Regelfall erfolgt diese als Kombination unterschiedlicher Antibiotikaklassen sowie Darreichungsformen (intravenös, oral und inhalativ) über häufig längere Zeiträume mit dem Ziel einer möglichst frühzeitigen und effektiven Eradikation [120].

Eine Besonderheit im Rahmen der Therapie bei CF ist die Möglichkeit der inhalativen Anwendung von Antibiotika wie Colistin oder Tobramycin mit dem Ziel, höhere lokale Konzentrationen bei gleichzeitig verringerter Toxizität erreichen zu können [104]. Dadurch erhofft man sich eine Reduktion bekannter systemischer Nebenwirkungen länger andauernder antibiotischer

Diskussion

Kombinationstherapie. Zudem zeigten Studien, dass im besonderen Mikromilieu des CF-Sputums aufgrund veränderter Pharmakokinetik und -dynamik mit einfacher Antibiotikatherapie nicht oder nur unzuverlässig ausreichende und stabile Antibiotikakonzentrationen erreicht werden können. Man versucht daher, dieses Problem durch einerseits Kombination von Antibiotika unterschiedlicher Wirkmechanismen und andererseits der Kombination aus intravenöser, oraler und inhalativer Darreichung zu umgehen [98]. Allerdings herrscht nach wie vor Unklarheit über die optimale Zusammensetzung, Dauer und Darreichungsform der Antibiose [121] und es herrscht Bedarf an weiteren Studien zur antibiotischen Kombinationstherapie im Rahmen der CF [116].

4.5 Bewertung und mögliche Erklärung beobachteter Synergien

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigten eine Reihe unterschiedlich ausgeprägter synergistischer sowie additiver Effekte der von uns untersuchten antibiotischen Kombinationen. Allerdings konnte keine der Kombinationen diese Wirkung gegenüber einer gesamten Spezies bestätigen. Die bereits beschriebene Stammspezifität der Wirkung ist damit zentraler Bestandteil unserer Ergebnisse. Ein entscheidender Grund hierfür ist mit Sicherheit die hohe Anpassungsfähigkeit und phänotypische Heterogenität der untersuchten Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* sowie *BCC* sowie ihre Fähigkeit, zusätzlich zu bereits vorhandenen intrinsischen Resistenzen weitere zu erwerben [59, 61, 147].

Im Folgenden wird noch einmal abschließend auf einzelne antibiotische Kombinationen sowie mögliche Mechanismen der Interaktion genauer eingegangen.

Ein überwiegender Teil der von uns untersuchten Antibiotikakombinationen beinhaltet als Bestandteil das Aminoglykosid Tobramycin. Es inhibiert die

Diskussion

bakterielle Proteinsynthese durch Bindung an die ribosomale 30S Untereinheit und entfaltet daher seine bakterizide Wirkung intrazellulär [165].

Als eine vielversprechende Kombination präsentierte sich in unseren Experimenten Tobramycin + Ceftazidim. Mit einem Median der FIC-Indizes von 0,5 lag die Kombination auf der Grenze zum Synergismus und zeigte besonders gegenüber Vertretern des *BCC* sowie *P. aeruginosa* gute Effektivität mit in einigen Fällen deutlich synergistischer Wirkung. Die schlechtere Wirksamkeit gegenüber *A. xylosoxidans* erklärt sich am ehesten aus der intrinsischen Resistenz dieser Bakterienspezies gegenüber Aminoglykosiden wie Tobramycin [68]. In diesem Fall erfolgte die Kombination mit Ceftazidim, einem Cephalosporin der 3. Generation. Es wirkt ebenfalls bakterizid, allerdings über Inhibition der bakteriellen Zellwandsynthese durch Bindung des Penicillin-bindenden-Proteins (PBP) [166]. Da diese beiden Antibiotika somit auf unterschiedlichen Ebenen des Bakteriums ansetzen (Zellwandsynthese gegenüber intrazellulärer Proteinsynthese), ist hier eine naheliegende Überlegung, dass die Aufnahme des Aminoglykosides in das Bakterium nach Inhibition einer korrekten Zellwandsynthese durch das Cephalosporin erhöht und damit seine intrazellulär bakterizide Wirkung am Ribosom verstärkt wird [167]. Zudem wird ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Lyse der inneren bakteriellen Membran postuliert [168]. Gleichzeitig konnte nach vorheriger artifizieller Lyse dieser Membran keine Reduktion synergistischer Effekte gezeigt werden, wodurch es sich hierbei wahrscheinlich nicht um den letztendlich ausschlaggebenden Effekt handelt [169].

Als eine weitere besonders vielversprechende Kombination präsentierte sich in unseren Ergebnissen Tobramycin + Cotrimoxazol. Ähnlich wie bereits Tobramycin + Ceftazidim ergab sich auch für diese Kombination ein Median der FIC- Indizes von 0,5 an der Grenze zu expliziter Synergie.

Diskussion

In diesen Fall wurde das intrazellulär die Proteinsynthese inhibierende Aminoglykosid Tobramycin mit dem ebenfalls intrazellulär wirkenden Cotrimoxazol kombiniert. Bei diesem handelt es sich um eine feste Kombination aus Sulfamethoxazol sowie Trimethoprim. Beide wirken, indem sie die bakterielle Synthese von Tetrahydrofolat inhibieren, einem essentiellen Baustein für die Synthese von DNA wie auch Proteinen [170]. Denkbar wäre daher eine Verstärkung der antimikrobiellen Effekte durch Kombination von Cotrimoxazol und Tobramycin, indem beide auf unterschiedlichen Ebenen der bakteriellen Proteinsynthese eingreifen und diese inhibieren. Bereits für Trimethoprim und Sulfamethoxazol lässt sich dieser Effekt beobachten, die beide für sich genommen bakteriostatisch und erst in Kombination bakterizid wirken, indem sie auf unterschiedlichen Ebenen in den gleichen Synthesemechanismus eingreifen [170].

Bereits in anderen Studien zeigten beide Antibiotika in Kombination gute Wirksamkeit, auch gegenüber bakteriellen Isolaten, die sich dem einzelnen Antibiotikum gegenüber zuvor unempfindlich gezeigt hatten und auch im Rahmen bakterieller Biofilmbildung [171]. In unseren Experimenten konnten wir teils deutlich synergistische Effekte gegenüber Stämmen des *BCC* zeigen, der ebenso zur Bildung von Biofilmen in der Lage ist. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, in denen Tobramycin und Cotrimoxazol als Teil unterschiedlicher Therapieschemata zur Eradikation pulmonaler Infektionen mit Stämmen des *BCC* Anwendung fanden [172, 173].

Auch für die übrigen von uns verwendeten antibiotischen Kombinationen konnten im Rahmen dieser Arbeit unterschiedlich ausgeprägte additive und synergistische Effekte gezeigt werden. Unabhängig von Kombination und Bakterienspezies stellten sich die antibiotischen Effekte durchweg als hoch stammspezifisch dar. Daraus ergibt sich, wie bereits erläutert, die Notwendigkeit zur niederschweligen und in die Routine einfließenden Kombinationstestung für Isolate im Rahmen der CF.

Um eine potenzielle antibiotische Abdeckung aller drei untersuchten Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* und *BCC* zu erreichen, können

Diskussion

auf Grundlage dieser Arbeit die folgenden antibiotischen Kombinationen zur weiteren klinischen Testung und bei gutem Ansprechen zur Implementierung in die Routinediagnostik im Rahmen der CF empfohlen werden:

Zweifachkombinationen:

- Tobramycin + Ceftazidim
- Tobramycin + Colistin
- Cotrimoxazol + Tobramycin

Dreifachkombinationen:

- Meropenem + Tobramycin + Colistin
- Moxifloxacin + Ceftazidim + Colistin

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun im Anschluss mit weiterführenden klinischen Daten korreliert werden, um zu sehen, in wieweit sich unsere Ergebnisse im späteren Therapieansprechen niederschlagen. Wir hoffen, einen Beitrag dazu leisten zu können, die diagnostische Lücke zwischen *in vitro* Sensibilitätstestung und klinischem Ansprechen ein Stück weiter zu schließen und damit die Effizienz antibiotischer Therapie respiratorischer Infektionen im Rahmen der CF - Therapie zu erhöhen.

4.6 Problematik der Korrelation einer *in vitro* Wirksamkeit mit klinischer Effektivität und Patientenoutcome

Für eine effizientere *in vivo* Antibiotikatherapie im Rahmen der CF herrscht dringender Bedarf an klinischen Studien, welche die *in vitro* sich als wirksam erwiesenen Antibiotikakombinationen im Hinblick auf ihre klinische Relevanz und Effektivität untersuchen.

Unmittelbar im Anschluss an diese Arbeit wurde daher in einer Kooperation mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik Tübingen mit der Analyse von Sputumproben von CF-Patient*innen begonnen. Im Rahmen dieser Sputumanalyse wird vor und nach Therapie mit von uns untersuchten Antibiotikakombinationen die Bakterienzahl und -zusammensetzung untersucht und mit unseren *in vitro* gewonnenen Daten korreliert. Wir erhoffen uns damit eine bessere Vorhersagbarkeit eines möglichen klinischen Erfolges sowie eine klare Aussage über den therapeutischen Nutzen der in unseren Experimenten vielversprechenden Antibiotika sowie ihrer Kombinationen. Zudem zielen wir darauf hin, von uns beobachtete bzw. auch bereits in der Literatur beschriebene Synergismen sowie additive Effekte der antibiotischen Kombinationen auch im klinischen Setting zu verifizieren.

Am Ende wollen wir in der Lage sein, klare Aussagen und Empfehlungen über probate antibiotische Kombinationen aussprechen zu können, die in die Routinetestung klinischer Patientenisolate im Rahmen der CF übernommen werden sollten. Das Ziel ist, damit eine stärker evidenzbasierte Ausrichtung sowie eine bessere Vorhersagbarkeit der antibiotischen Therapie im Rahmen der CF zu erreichen.

4.7 Etablierung einer Methodik für die CF-Routinediagnostik

Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten wir die Methodik der manuellen Mikrobouillondilution. Dies ermöglichte uns eine sehr individuelle und differenzierte Anpassung der Konzentrationen antibiotischer Kombinationen. Zugleich handelt es sich aber um ein aufwendiges und in der Routine so nicht durchführbares Verfahren. Unser Ziel ist es daher, eine Methodik zu etablieren, mit der schnell und unkompliziert jedes einzelne Patientenisolat im Rahmen der CF hinsichtlich seiner Sensibilität gegenüber antibiotischen Kombinationen getestet werden kann. Die Notwendigkeit für eine individuelle und standardisierte Sensibilitätstestung ergibt sich insbesondere aufgrund der hohen Stammspezifität der antibiotischen sowie der synergistischen Effekte, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Unser Ziel ist es, nach Korrelation mit den klinischen Daten der Sputumanalyse, zur Herstellung von 96-Well Platten mit den vielsprechenden Antibiotikakombinationen sowie -konzentrationen beizutragen, die mit fixen Konzentrationen unkompliziert in der CF-Routinediagnostik eingesetzt werden können.

Alternativ denkbar wäre ebenso eine Routinetestung von Antibiotikakombinationen mittels Agardiffusion (E-Test). Auch hiermit können unterschiedliche Kombinationen untersucht werden, indem die entsprechenden Teststreifen rechtwinklig auf der Agarplatte angeordnet und nach entsprechender Inkubation die Schnittpunkte der Hemmhöfe mit den Streifen abgelesen werden. Es handelt sich zudem um eine auch in anderen Studien bereits angewandte Methodik [174]. Um diese Möglichkeit evaluieren zu können ist im Anschluss an diese Arbeit die Korrelation unserer Ergebnisse mit denen einer antibiotischen Kombinationstestung mittels Agardiffusion angestrebt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Zystischen Fibrose bestimmen nach wie vor häufig chronisch rezidivierende respiratorische Infektionen Verlauf und Prognose dieser Multisystemerkrankung [19, 124]. Auslöser der inflammatorischen Prozesse sind komplexe polymikrobielle Gemeinschaften, die vielfach einen hohen Grad an Resistenz und Anpassungsfähigkeit zeigen [20]. Trotz großer Fortschritte in der Therapie der Zystischen Fibrose, wie beispielsweise durch den Einsatz von CFTR-Modulatoren, die die Lebensqualität und Prognose vieler Patient*innen deutlich verbessern konnten, besteht eine wichtige Säule der interdisziplinären Therapie weiterhin aus frühzeitiger und wiederholter antibiotischer Therapie [134]. Es kommen Therapieregime mit Kombinationen verschiedener Antibiotika unterschiedlicher Wirkmechanismen und Applikationsformen mit dem Ziel einer effizienten und gleichzeitig möglichst nebenwirkungsarmen bakteriellen Eradikation zum Einsatz [120, 124].

Die schlechte Vorhersagbarkeit klinischer Effektivität sowie die Komplexität des respiratorischen Mikromilieus stellen zentrale Herausforderungen in der Therapie der Zystischen Fibrose dar. Darin begründet sich dringender Bedarf an systematischer Evidenz hinsichtlich geeigneter *in vitro* Testverfahren und der letztendlich optimalen Zusammensetzung und Dauer der antibiotischen Therapie [116].

Diese Arbeit befasst sich mit den Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* sowie dem *Burkholderia cepacia* Komplex, die alle drei mit schwerwiegenden und häufig chronifizierenden respiratorischen Infektionen im Rahmen der Zystischen Fibrose assoziiert sind. Verschiedene therapeutisch relevante Antibiotika wurden einzeln und in Kombination hinsichtlich ihrer *in vitro* Effektivität und ihrer synergistischen Effekte gegenüber den drei genannten Bakterienspezies mittels des Verfahrens der manuellen Mikrobouillondilution untersucht. Die so erzielten Ergebnisse wurden mit weiteren Methoden der mikrobiologischen Routinediagnostik verglichen mit dem Ziel, eine Methodik zur routinemäßigen antibiotischen Kombinationstestung im Rahmen der Zystischen Fibrose zu implementieren.

Zusammenfassung

Die Experimente zeigten eine gute Wirksamkeit unterschiedlicher Antibiotika und antibiotischer Kombination gegenüber allen drei Bakterienspezies. Erreichte das einzelne Antibiotikum alleine keine ausreichende Effektivität, gelang es oftmals, durch Hinzunahme eines weiteren Kombinationspartners das bakterielle Ansprechen maßgeblich zu verbessern. Für unterschiedliche Kombinationen ließen sich in den Experimenten zudem klar synergistische Effekte mit FIC-Indizes deutlich unterhalb von 0,5 nachweisen.

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist die durchweg ausgesprochene Stammspezifität der antibiotischen Effektivität und der beobachteten Synergismen. Bei guter antibiotischer Wirksamkeit gegenüber den einzelnen Bakterienstämmen konnte auf Grundlage der Ergebnisse keine allgemeine Aussage bezogen auf eine gesamte Spezies getroffen werden.

Daraus resultiert im Rahmen der Therapie der Zystischen Fibrose die zwingende Notwendigkeit einer stammspezifischen Sensibilitätstestung bakterieller Isolate hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Kombinationen.

Auf dieser Arbeit aufbauend soll die Effektivität der untersuchten Kombinationen im Anschluss in einer Kooperation mit der CF-Ambulanz der Kinderklinik Tübingen *in vivo* untersucht und mit den hier vorgestellten *in vitro* Ergebnissen korreliert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können einen Beitrag zur Implementierung der antibiotischen Kombinationstestung in der Routinediagnostik bei Zystischer Fibrose leisten, um die Vorhersagbarkeit therapeutischer Effektivität zu erhöhen. Durch Korrelation der *in vitro* Ergebnisse mit klinischen Daten ist das weiterführende Ziel, in Zukunft eindeutige Empfehlungen hinsichtlich einer effektiven antibiotischen Therapie im Rahmen der Zystischen Fibrose aussprechen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Rather, M.A., K. Gupta, and M. Mandal, *Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies*. Braz J Microbiol, 2021. **52**(4): p. 1701-1718.
2. Musken, M., et al., *Breaking the Vicious Cycle of Antibiotic Killing and Regrowth of Biofilm-Residing Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(12).
3. Sommerburg, O., et al., *Final results of the southwest German pilot study on cystic fibrosis newborn screening - Evaluation of an IRT/PAP protocol with IRT-dependent safety net*. J Cyst Fibros, 2022. **21**(3): p. 422-433.
4. Munck, A., et al., *European survey of newborn bloodspot screening for CF: opportunity to address challenges and improve performance*. J Cyst Fibros, 2023. **22**(3): p. 484-495.
5. Cutting, G.R., *Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(1): p. 45-56.
6. Dickinson, K.M. and J.M. Collaco, *Cystic Fibrosis*. Pediatr Rev, 2021. **42**(2): p. 55-67.
7. Chen, Q., Y. Shen, and J. Zheng, *A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects*. Animal Model Exp Med, 2021. **4**(3): p. 220-232.
8. Brennan, M.L. and I. Schrijver, *Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas*. J Mol Diagn, 2016. **18**(1): p. 3-14.
9. Polgreen, P.M. and A.P. Comellas, *Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Carriers*. Annu Rev Med, 2022. **73**: p. 563-574.
10. Hallouch, O., et al., *Cystic fibrosis in the 21st century: what every radiologist should know*. Clin Imaging, 2022. **84**: p. 118-129.
11. Allen, L., et al., *Future therapies for cystic fibrosis*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 693.
12. Cocorullo, M., L.R. Chiarelli, and G. Stelitano, *Improving Protection to Prevent Bacterial Infections: Preliminary Applications of Reverse Vaccinology against the Main Cystic Fibrosis Pathogens*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(7).
13. L.Nährlich, M.B., J. Wosniok, *Deutsches Mukoviszidose-Register Berichtsband. 2022*. p. 55.
14. Ratchford, T.L., J.H. Teckman, and D.R. Patel, *Gastrointestinal pathophysiology and nutrition in cystic fibrosis*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **12**(9): p. 853-862.
15. Anton-Paduraru, D.T., et al., *An Update in Cystic Fibrosis-Related Diabetes in Children and Adolescents*. Children (Basel), 2023. **10**(12).
16. Sabharwal, S., *Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2016. **12**(1): p. 43-7.
17. Sherwood, J.S., et al., *Cystic fibrosis related liver disease and endocrine considerations*. J Clin Transl Endocrinol, 2022. **27**: p. 100283.
18. Naz Khan, F., et al., *CF and male health: Sexual and reproductive health, hypogonadism, and fertility*. J Clin Transl Endocrinol, 2022. **27**: p. 100288.
19. Turcios, N.L., *Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview*. Respir Care, 2020. **65**(2): p. 233-251.
20. Filkins, L.M. and G.A. O'Toole, *Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005258.

Literaturverzeichnis

21. Rogers, G.B., et al., *Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3548-58.
22. Zhao, J., et al., *Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5809-14.
23. Blanchard, A.C. and V.J. Waters, *Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease*. Semin Respir Crit Care Med, 2019. **40**(6): p. 727-736.
24. Willger, S.D., et al., *Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis*. Microbiome, 2014. **2**: p. 40.
25. Park, I.K. and K.N. Olivier, *Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis*. Semin Respir Crit Care Med, 2015. **36**(2): p. 217-24.
26. Cohen-Cymerknoh, M., D. Shoseyov, and E. Kerem, *Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(11): p. 1463-71.
27. Zhao, A., J. Sun, and Y. Liu, *Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies*. Front Cell Infect Microbiol, 2023. **13**: p. 1137947.
28. Jean-Pierre, V., et al., *Biofilm Formation by Staphylococcus aureus in the Specific Context of Cystic Fibrosis*. Int J Mol Sci, 2022. **24**(1).
29. Perikleous, E.P., et al., *Antibiotic Resistance in Patients with Cystic Fibrosis: Past, Present, and Future*. Antibiotics (Basel), 2023. **12**(2).
30. Wood, S.J., T.M. Kuzel, and S.H. Shafikhani, *Pseudomonas aeruginosa: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics*. Cells, 2023. **12**(1).
31. Osmon, S., et al., *Hospital mortality for patients with bacteremia due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa*. Chest, 2004. **125**(2): p. 607-16.
32. Gjodsbol, K., et al., *Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study*. Int Wound J, 2006. **3**(3): p. 225-31.
33. Wang, M.C., et al., *Ear problems in swimmers*. J Chin Med Assoc, 2005. **68**(8): p. 347-52.
34. Pressler, T., et al., *Chronic Pseudomonas aeruginosa infection definition: EuroCareCF Working Group report*. J Cyst Fibros, 2011. **10 Suppl 2**: p. S75-8.
35. Treggiari, M.M., et al., *Approach to eradication of initial Pseudomonas aeruginosa infection in children with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2007. **42**(9): p. 751-6.
36. Jimenez, P.N., et al., *The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(1): p. 46-65.
37. Montor, W.R., et al., *Genome-wide study of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays*. Infect Immun, 2009. **77**(11): p. 4877-86.
38. Jurado-Martin, I., M. Sainz-Mejias, and S. McClean, *Pseudomonas aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
39. King, J.D., et al., *Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. Innate Immun, 2009. **15**(5): p. 261-312.
40. Chevalier, S., et al., *Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(5): p. 698-722.
41. Schwarzer, C., H. Fischer, and T.E. Machen, *Chemotaxis and Binding of Pseudomonas aeruginosa to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150109.

Literaturverzeichnis

42. Guttenplan, S.B. and D.B. Kearns, *Regulation of flagellar motility during biofilm formation*. FEMS Microbiol Rev, 2013. **37**(6): p. 849-71.
43. Tala, L., et al., *Pseudomonas aeruginosa orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements*. Nat Microbiol, 2019. **4**(5): p. 774-780.
44. Bleves, S., et al., *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(8): p. 534-43.
45. Zhao, K., et al., *TesG is a type I secretion effector of Pseudomonas aeruginosa that suppresses the host immune response during chronic infection*. Nat Microbiol, 2019. **4**(3): p. 459-469.
46. Anantharajah, A., M.P. Mingeot-Leclercq, and F. Van Bambeke, *Targeting the Type Three Secretion System in Pseudomonas aeruginosa*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(9): p. 734-749.
47. Cornelis, P. and J. Dingemans, *Pseudomonas aeruginosa adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 75.
48. Moradali, M.F., S. Ghods, and B.H. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 39.
49. Smith, E.E., et al., *Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8487-92.
50. Lee, J. and L. Zhang, *The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell, 2015. **6**(1): p. 26-41.
51. Bianconi, I., et al., *Comparative genomics and biological characterization of sequential Pseudomonas aeruginosa isolates from persistent airways infection*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 1105.
52. Lopez-Causape, C., et al., *The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions*. Expert Rev Respir Med, 2015. **9**(1): p. 73-88.
53. Feliziani, S., et al., *Coexistence and within-host evolution of diversified lineages of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in long-term cystic fibrosis infections*. PLoS Genet, 2014. **10**(10): p. e1004651.
54. Malone, J.G., *Role of small colony variants in persistence of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis lungs*. Infect Drug Resist, 2015. **8**: p. 237-47.
55. Lee, K. and S.S. Yoon, *Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness*. J Microbiol Biotechnol, 2017. **27**(6): p. 1053-1064.
56. Mann, E.E. and D.J. Wozniak, *Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(4): p. 893-916.
57. Taylor, P.K., A.T. Yeung, and R.E. Hancock, *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies*. J Biotechnol, 2014. **191**: p. 121-30.
58. Bartell, J.A., et al., *Bacterial persisters in long-term infection: Emergence and fitness in a complex host environment*. PLoS Pathog, 2020. **16**(12): p. e1009112.
59. Pang, Z., et al., *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. Biotechnol Adv, 2019. **37**(1): p. 177-192.
60. Gellatly, S.L. and R.E. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathog Dis, 2013. **67**(3): p. 159-73.
61. Veschetti, L., et al., *Achromobacter spp. prevalence and adaptation in cystic fibrosis lung infection*. Microbiol Res, 2022. **263**: p. 127140.
62. Jeukens, J., et al., *A Pan-Genomic Approach to Understand the Basis of Host Adaptation in Achromobacter*. Genome Biol Evol, 2017. **9**(4): p. 1030-1046.

Literaturverzeichnis

63. Hansen, C.R., et al., *Inflammation in Achromobacter xylosoxidans infected cystic fibrosis patients*. J Cyst Fibros, 2010. **9**(1): p. 51-8.
64. Ridderberg, W., K. Jensen Handberg, and N. Norskov-Lauritsen, *Prevalence of hypermutator isolates of Achromobacter spp. from cystic fibrosis patients*. Int J Med Microbiol, 2020. **310**(2): p. 151393.
65. Edwards, B.D., et al., *Prevalence and Outcomes of Achromobacter Species Infections in Adults with Cystic Fibrosis: a North American Cohort Study*. J Clin Microbiol, 2017. **55**(7): p. 2074-2085.
66. Esposito, S., et al., *What is the role of Achromobacter species in patients with cystic fibrosis?* Front Biosci (Landmark Ed), 2021. **26**(12): p. 1613-1620.
67. Veschetti, L., et al., *Mobilome Analysis of Achromobacter spp. Isolates from Chronic and Occasional Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients*. Microorganisms, 2021. **9**(1).
68. Menetrey, Q., et al., *Achromobacter xylosoxidans and Stenotrophomonas maltophilia: Emerging Pathogens Well-Armed for Life in the Cystic Fibrosis Patients' Lung*. Genes (Basel), 2021. **12**(5).
69. Tessmer, M.H., et al., *Identification and Verification of Ubiquitin-Activated Bacterial Phospholipases*. Journal of Bacteriology, 2019. **201**(4): p. 10.1128/jb.00623-18.
70. Pickrum, A.M., et al., *Achromobacter xylosoxidans Cellular Pathology Is Correlated with Activation of a Type III Secretion System*. Infection and Immunity, 2020. **88**(7): p. 10.1128/iai.00136-20.
71. Filipic, B., et al., *Uncovering Differences in Virulence Markers Associated with Achromobacter Species of CF and Non-CF Origin*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017. **7**.
72. Trancassini, M., et al., *Outbreak of Achromobacter xylosoxidans in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 138.
73. Tom, S.K., et al., *Effect of High-Dose Antimicrobials on Biofilm Growth of Achromobacter Species Isolated from Cystic Fibrosis Patients*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. **60**(1): p. 650-652.
74. Isler, B., et al., *Achromobacter Infections and Treatment Options*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(11).
75. Abbott, I.J. and A.Y. Peleg, *Stenotrophomonas, Achromobacter, and nonmelioid Burkholderia species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies*. Semin Respir Crit Care Med, 2015. **36**(1): p. 99-110.
76. Lord, R., A.M. Jones, and A. Horsley, *Antibiotic treatment for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation*. Cochrane Database Syst Rev, 2020. **4**(4): p. CD009529.
77. Mahenthalingam, E., A. Baldwin, and C.G. Dowson, *Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology*. Journal of Applied Microbiology, 2008. **104**(6): p. 1539-1551.
78. Drevinek, P. and E. Mahenthalingam, *Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(7): p. 821-30.
79. Horsley, A., A.M. Jones, and R. Lord, *Antibiotic treatment for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **2016**(1): p. CD009529.
80. Biddick, R., et al., *Evidence of transmission of Burkholderia cepacia, Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **228**(1): p. 57-62.

Literaturverzeichnis

81. Dacco, V., et al., *Cepacia syndrome in cystic fibrosis: A systematic review of the literature and possible new perspectives in treatment*. *Pediatr Pulmonol*, 2023. **58**(5): p. 1337-1343.
82. Drevinek, P., et al., *Oxidative stress of Burkholderia cenocepacia induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(1): p. 34-40.
83. Lewenza, S., et al., *Quorum sensing in Burkholderia cepacia: identification of the LuxRI homologs CepRI*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(3): p. 748-56.
84. Drevinek, P., et al., *Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when Burkholderia cenocepacia grows in cystic fibrosis sputum*. *BMC Infect Dis*, 2008. **8**: p. 121.
85. Spencer, H.K., et al., *An Overview of the Treatment of Less Common Non-Lactose-Fermenting Gram-Negative Bacteria*. *Pharmacotherapy*, 2020. **40**(9): p. 936-951.
86. Frost, F., M. Shaw, and D. Nazareth, *Antibiotic therapy for chronic infection with Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021. **12**(12): p. CD013079.
87. Rhodes, K.A. and H.P. Schweizer, *Antibiotic resistance in Burkholderia species*. *Drug Resist Updat*, 2016. **28**: p. 82-90.
88. Holden, M.T., et al., *The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(1): p. 261-77.
89. Tomich, M., et al., *Role of flagella in host cell invasion by Burkholderia cepacia*. *Infect Immun*, 2002. **70**(4): p. 1799-806.
90. Corbett, C.R., et al., *An extracellular zinc metalloprotease gene of Burkholderia cepacia*. *Microbiology (Reading)*, 2003. **149**(Pt 8): p. 2263-2271.
91. Akkerman-Nijland, A.M., et al., *The pharmacokinetics of antibiotics in cystic fibrosis*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021. **17**(1): p. 53-68.
92. Khan, T.Z., et al., *Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **151**(4): p. 1075-82.
93. Caverly, L.J. and J.J. LiPuma, *Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice*. *Expert Rev Respir Med*, 2018. **12**(10): p. 857-865.
94. Kidd, T.J., et al., *Defining antimicrobial resistance in cystic fibrosis*. *J Cyst Fibros*, 2018. **17**(6): p. 696-704.
95. Bos, A.C., et al., *The fate of inhaled antibiotics after deposition in cystic fibrosis: How to get drug to the bug?* *J Cyst Fibros*, 2017. **16**(1): p. 13-23.
96. Ciofu, O., et al., *Antibiotic treatment of biofilm infections*. *APMIS*, 2017. **125**(4): p. 304-319.
97. Bugli, F., et al., *Antimicrobial peptides for tackling cystic fibrosis related bacterial infections: A review*. *Microbiol Res*, 2022. **263**: p. 127152.
98. Castagnola, E., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in cystic fibrosis: a narrative review*. *Int J Antimicrob Agents*, 2021. **58**(3): p. 106381.
99. Shah, D. and M. Narang, *Meropenem*. *Indian Pediatr*, 2005. **42**(5): p. 443-50.
100. Baldwin, C.M., K.A. Lyseng-Williamson, and S.J. Keam, *Meropenem: a review of its use in the treatment of serious bacterial infections*. *Drugs*, 2008. **68**(6): p. 803-38.
101. Kamp, J.C., et al., *Pharmacokinetics of Meropenem in People with Cystic Fibrosis-A Proof of Concept Clinical Trial*. *Antibiotics (Basel)*, 2021. **10**(3).

Literaturverzeichnis

102. El-Sayed Ahmed, M.A.E., et al., *Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019)*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 868-885.
103. Tran, T.B., et al., *Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?* Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(6): p. 592-597.
104. Taccetti, G., et al., *Cystic Fibrosis: Recent Insights into Inhaled Antibiotic Treatment and Future Perspectives*. Antibiotics (Basel), 2021. **10**(3).
105. Koch-Weser, J., et al., *Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy*. Ann Intern Med, 1970. **72**(6): p. 857-68.
106. Falagas, M.E., P.I. Rafailidis, and D.K. Matthaïou, *Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options*. Drug Resist Updat, 2010. **13**(4-5): p. 132-8.
107. Ramsey, B.W., et al., *Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis*. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med, 1999. **340**(1): p. 23-30.
108. Hamed, K. and L. Debonnett, *Tobramycin inhalation powder for the treatment of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: a review based on clinical evidence*. Ther Adv Respir Dis, 2017. **11**(5): p. 193-209.
109. Smith, S. and N.J. Rowbotham, *Inhaled anti-pseudomonal antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2022. **11**(11): p. CD001021.
110. Matesanz, M. and J. Mensa, *Ceftazidime-avibactam*. Rev Esp Quimioter, 2021. **34 Suppl 1**(Suppl1): p. 38-40.
111. Horcajada, J.P., et al., *Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Infections*. Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(4).
112. Marnier, M., et al., *Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam, Ceftolozane-Tazobactam, Cefiderocol, and Novel Darobactin Analogs against Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates from Pediatric and Adolescent Cystic Fibrosis Patients*. Microbiol Spectr, 2023. **11**(1): p. e0443722.
113. Pereira, R.H., et al., *Patterns of virulence factor expression and antimicrobial resistance in Achromobacter xylosoxidans and Achromobacter ruhlandii isolates from patients with cystic fibrosis*. Epidemiol Infect, 2017. **145**(3): p. 600-606.
114. Andriole, V.T., *The quinolones: past, present, and future*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 2**: p. S113-9.
115. El-Halfawy, O.M., M.M. Naguib, and M.A. Valvano, *Novel antibiotic combinations proposed for treatment of Burkholderia cepacia complex infections*. Antimicrob Resist Infect Control, 2017. **6**: p. 120.
116. Holland, P. and N. Jahnke, *Single versus combination intravenous anti-pseudomonal antibiotic therapy for people with cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **6**(6): p. CD002007.
117. Ciuca, I.M., et al., *Antibiotherapy in Children with Cystic Fibrosis-An Extensive Review*. Children (Basel), 2022. **9**(8).
118. Gastine, S., et al., *Simultaneous pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) assessment of ampicillin and gentamicin in the treatment of neonatal sepsis*. J Antimicrob Chemother, 2022. **77**(2): p. 448-456.
119. Park, M., et al., *Antimicrobial Synergy between Aminoglycosides and Licorice Extract in Listeria monocytogenes*. Pathogens, 2022. **11**(4).

Literaturverzeichnis

120. Kunz Coyne, A.J., et al., *Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther*, 2022. **11**(2): p. 661-682.
121. Langton Hewer, S.C., et al., *Antibiotic strategies for eradicating Pseudomonas aeruginosa in people with cystic fibrosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023. **6**(6): p. CD004197.
122. Bidaud, A.L., et al., *Techniques for the Assessment of In Vitro and In Vivo Antifungal Combinations*. *J Fungi (Basel)*, 2021. **7**(2).
123. Berenbaum, M.C., *A method for testing for synergy with any number of agents*. *J Infect Dis*, 1978. **137**(2): p. 122-30.
124. Diab Caceres, L. and E. Zamarron de Lucas, *Cystic fibrosis: Epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment*. *Med Clin (Barc)*, 2023. **161**(9): p. 389-396.
125. Jeukens, J., et al., *Complete Genome Sequence of Persistent Cystic Fibrosis Isolate Pseudomonas aeruginosa Strain RP73*. *Genome Announc*, 2013. **1**(4).
126. Dhawale, M.R. and E.H. Creaser, *Analysis of an L-histidinol-utilizing mutant of Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*, 1975. **91**(2): p. 241-8.
127. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. *Nature*, 2000. **406**(6799): p. 959-64.
128. Takahashi, E., et al., *Effect of antibiotics on extracellular protein level in Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid*, 2016. **84-85**: p. 44-50.
129. Crooks, C., J.M. Palmer, and D.L. Lindner, *Draft Genome Sequence of Burkholderia cepacia ATCC 17759, a Polyhydroxybutyrate-Co-Valerate Copolymer-Producing Bacterium*. *Genome Announc*, 2018. **6**(17).
130. Zusman, O., et al., *Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(10): p. 5104-11.
131. CLSI, *CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024*. 2024.
132. Gutierrez Santana, J.C. and V.R. Coria Jimenez, *Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis: critical gaps in diagnosis and therapy*. *Ann Med*, 2024. **56**(1): p. 2307503.
133. Regard, L., et al., *CFTR Modulators in People with Cystic Fibrosis: Real-World Evidence in France*. *Cells*, 2022. **11**(11).
134. Ong, T. and B.W. Ramsey, *Cystic Fibrosis: A Review*. *JAMA*, 2023. **329**(21): p. 1859-1871.
135. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) and G.f.P.P.e.V. (GPP), *Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP)/ Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie e.V. (GPP) Lungenerkrankung bei Mukoviszidose: Pseudomonas aeruginosa*. 2022.
136. Smith, S., et al., *Combination antimicrobial susceptibility testing for acute exacerbations in chronic infection of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020. **5**(5): p. CD006961.
137. Schobert, M. and P. Tielen, *Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol*, 2010. **5**(4): p. 603-21.
138. Smith, S., et al., *Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020. **6**(6): p. CD009528.
139. Foweraker, J.E., et al., *Phenotypic variability of Pseudomonas aeruginosa in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its*

Literaturverzeichnis

- impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing.* J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(6): p. 921-7.
140. Gilligan, P.H., *Is there value in susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa causing chronic infection in patients with cystic fibrosis?* Expert Rev Anti Infect Ther, 2006. **4**(5): p. 711-5.
141. Moskowitz, S.M., et al., *Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 1915-22.
142. Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1771-6.
143. Palladini, G., et al., *Comparison between broth microdilution and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of bovine mastitis pathogens.* J Microbiol Methods, 2023. **212**: p. 106796.
144. Datar, R., et al., *Automated antimicrobial susceptibility testing of slow-growing Pseudomonas aeruginosa strains in the presence of tetrazolium salt WST-1.* J Microbiol Methods, 2021. **186**: p. 106252.
145. Bhalodi, A.A., et al., *Variability of Beta-Lactam Broth Microdilution for Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother, 2021. **65**(10): p. e0064021.
146. Rossi, E., et al., *Pseudomonas aeruginosa adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis.* Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(5): p. 331-342.
147. Sfeir, M.M., *Burkholderia cepacia complex infections: More complex than the bacterium name suggest.* J Infect, 2018. **77**(3): p. 166-170.
148. Bender, J.K., et al., *Combined Clinical, Epidemiological, and Genome-Based Analysis Identified a Nationwide Outbreak of Burkholderia cepacia Complex Infections Caused by Contaminated Mouthwash Solutions.* Open Forum Infect Dis, 2022. **9**(5): p. ofac114.
149. Tufekci, S., et al., *Burkholderia cepacia complex bacteremia outbreaks among non-cystic fibrosis patients in the pediatric unit of a university hospital.* Turk J Pediatr, 2021. **63**(2): p. 218-222.
150. *Front Matter*, in *Manual of Clinical Microbiology*. 2015. p. i-xxvii.
151. Van Dalem, A., et al., *In Vitro Susceptibility of Burkholderia cepacia Complex Isolated from Cystic Fibrosis Patients to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam.* Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(9).
152. Lupo, A., et al., *Clonality and Antimicrobial Susceptibility of Burkholderia cepacia complex Isolates Collected from Cystic Fibrosis Patients during 1998-2013 in Bern, Switzerland.* New Microbiol, 2015. **38**(2): p. 281-8.
153. Antimicrobial Resistance, C., *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis.* Lancet, 2022. **399**(10325): p. 629-655.
154. Moss, R.B., *Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis.* Chest, 2002. **121**(1): p. 55-63.
155. Cohen-Cymbarknoh, M., et al., *Eradication failure of newly acquired Pseudomonas aeruginosa isolates in cystic fibrosis.* J Cyst Fibros, 2016. **15**(6): p. 776-782.
156. Sherrard, L.J., M.M. Tunney, and J.S. Elborn, *Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis.* Lancet, 2014. **384**(9944): p. 703-13.
157. Elborn, J.S., et al., *Safety and efficacy of prolonged levofloxacin inhalation solution (APT-1026) treatment for cystic fibrosis and chronic Pseudomonas aeruginosa airway infection.* J Cyst Fibros, 2016. **15**(5): p. 634-40.

Literaturverzeichnis

158. Recio, R., et al., *Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(2).
159. Tangden, T., *Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria*. Ups J Med Sci, 2014. **119**(2): p. 149-53.
160. Kumar, A., et al., *A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study*. Crit Care Med, 2010. **38**(8): p. 1651-64.
161. Safdar, N., J. Handelsman, and D.G. Maki, *Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(8): p. 519-27.
162. Paul, M., et al., *Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **2014**(1): p. CD003344.
163. Tamma, P.D., S.E. Cosgrove, and L.L. Maragakis, *Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(3): p. 450-70.
164. Kumar, A., et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Crit Care Med, 2006. **34**(6): p. 1589-96.
165. Neu, H.C., *Tobramycin: an overview*. J Infect Dis, 1976. **134** Suppl: p. S3-19.
166. Sanz Herrero, F., *Ceftazidime-avibactam*. Rev Esp Quimioter, 2022. **35** Suppl 1(Suppl 1): p. 40-42.
167. Giamarellou, H., *Aminoglycosides plus beta-lactams against gram-negative organisms. Evaluation of in vitro synergy and chemical interactions*. Am J Med, 1986. **80**(6B): p. 126-37.
168. Bryan, L.E. and S. Kwan, *Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **23**(6): p. 835-45.
169. Scudamore, R.A. and M. Goldner, *Penetration of the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa by synergistic combinations of beta-lactam and aminoglycoside antibiotics*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1982. **21**(6): p. 1007-1010.
170. Kemnic, T.R. and M. Coleman, *Trimethoprim Sulfamethoxazole*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL).
171. Gastaldi Guerrieri, C., et al., *Remarkable antibiofilm activity of ciprofloxacin, cefoxitin, and tobramycin, by themselves or in combination, against enteroaggregative Escherichia coli in vitro*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2023. **107**(3): p. 116048.
172. Garcia, B.A., et al., *Implementation of a successful eradication protocol for Burkholderia Cepacia complex in cystic fibrosis patients*. BMC Pulm Med, 2018. **18**(1): p. 35.
173. Akkerman-Nijland, A.M., et al., *Eradication of Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis patients with inhalation of amiloride and tobramycin combined with oral cotrimoxazole*. ERJ Open Res, 2023. **9**(3).
174. Okoliegbe, I.N., et al., *Trends of Antimicrobial Resistance and Combination Susceptibility Testing of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic Fibrosis Patients: a 10-Year Update*. Antimicrob Agents Chemother, 2021. **65**(6).

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Betreuung von Apl. Prof. Dr. Christiane Wolz sowie Dr. rer. nat. Annika Schmidt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Annika Schmidt, Medizinische Fachmikrobiologin sowie Dr. Philipp Utz, Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Annika Schmidt von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Annika Schmidt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Danksagung

8 Danksagung

Ich möchte mich hiermit in aller Form bei all denjenigen bedanken, die mich in unterschiedlichster Weise bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Ich danke Prof. Christiane Wolz für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich Dr. Annika Schmidt danken, die nicht nur durch Konzeption und ausgezeichnete Betreuung dieses Projekt erst ermöglichte, sondern meine Promotionszeit durch ihre fachliche und vor allem menschliche Kompetenz weit über die eigentliche Thematik hinausgehend bereicherte. Durch ihre immer neuen Ideen und Vorschläge, ihre geduldige und motivierende Art sowie ihre Begeisterung für die Thematik war sie für mir stets ein Vorbild. Die gesamte Zeit über war sie offen für Diskussionen und stand mir gleichzeitig jeder Zeit unkompliziert mit ihrer sehr persönlich zugewandten und freundlichen Art bei allen Fragen zur Seite. In Kombination mit ihrer hohen fachlichen Kompetenz wurde die Zeit damit zu einer für mich prägenden und bereichernden Erfahrung.

Ein großer Dank gilt darüber hinaus dem Mukoviszidose e.V., Bundesverband Cystische Fibrose, der diese Arbeit finanziell unterstützte.

Auch gilt mein Dank meinen engen Freunden, die in unterschiedlicher Form meinen Arbeitsprozess begleitet haben und diesen zu einer für mich letztendlich sehr erfreulichen und angenehmen Zeit machten.

Am Ende möchte ich meinen Eltern und Jakob danken, die nicht nur durch fachlichen Rat und wohldosierte Beharrlichkeit zur rechten Zeit entscheidend zum Vorankommen dieser Arbeit beigetragen haben, sondern mir viel mehr seit jeher in allen für mich wichtigen Dingen in meinem Leben in unglaublich bedeutsamer, verständnisvoller und motivierender Weise zur Seite stehen und mich zu jeder Zeit uneingeschränkt unterstützen.