

Diplomarbeit

**Der Einfluss der Hydrolyse von Tadim[®]
(Colistinmethansulfat) auf dessen antibakterielle
Wirksamkeit**

**The influence of hydrolysis on the antibacterial activity
of Tadim[®] (colistin methanesulfonate)**

eingereicht von

Sven Heldt

Geb.-Dat.: 29.09.1987

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin
Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin**

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Dr. Ines Zollner-Schwetz

und

Univ.-Prof. Dr. Robert Krause

Graz, der 10.02.2014

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 10.02.2014

(Unterschrift)

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Priv.-Doz. Dr. Ines Zollner-Schwetz und Univ.-Prof. Dr. Robert Krause für die außerordentlich gute Betreuung während der Entstehung der Diplomarbeit bedanken. Ein ebenso großer Dank geht an das Team des mikrobiologischen Labors für die Einarbeitung in die Laborarbeit und den hervorragenden organisatorischen Einsatz während der Versuche.

An dieser Stelle genannt werden sollen ebenfalls meine Eltern und meine Schwester, die mir durch ihre langjährige Unterstützung dieses Studium überhaupt erst möglich machten und mir mit Rat und Tat jederzeit zur Seite standen.

Ein extra großer Dank geht auch an meine Freundin Sandra für ihren liebevollen Beistand und insbesondere ihre unerschöpfliche Geduld mit mir während der Zeit der Laborarbeit und des Schreibens und darüber hinaus. Bissh di Beste. :)

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	4
Zusammenfassung	5
Abstract.....	6
Einleitung	7
1) Einteilung und Entstehung von Antibiotikaresistenzen	7
2) Resistenzmechanismen gegenüber den wichtigsten Antibiotikagruppen bei Infektionen gram-negativer Erreger.....	9
2.1. Resistenzmechanismen gegenüber β -Lactam-Antibiotika	9
2.2. Resistenzmechanismen gegenüber Aminoglykosiden.....	12
2.3. Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen.....	12
3) Spezielle gram-negative Keime.....	12
3.1. <i>Klebsiella spp.</i> und <i>Enterobacter spp.</i>	13
3.2. <i>Pseudomonas spp.</i>	14
3.3. <i>Acinetobacter spp.</i>	15
3.4. <i>Chryseobacterium spp.</i>	15
4) Therapie von Infektionen durch multiresistente gram-negative Bakterien	16
4.1. Last-Line-Antibiotika gegen gram-negative Erreger	16
4.2. Momentaner Stand der Entwicklung neuer Antibiotika gegen das gram- negative Erregerspektrum.....	16
5) Colistin	17
5.1. Überblick und Anwendungsbereiche	17
5.2. Chemische Eigenschaften und Wirkmechanismus.....	19
5.3. Resistenzmechanismus	20
5.4. Pharmakokinetik.....	22
5.5. Nebenwirkungen.....	23
6) Ziele dieser Arbeit	24

Material und Methoden	25
1) Versuchsaufbau	25
1.1. Plättchendiffusionstest.....	25
1.2. Quantitative Kulturen	26
2) Bakterienpopulationen.....	27
3) Datenauswertung	27
Ergebnisse.....	29
1) Plättchendiffusionstest.....	29
2) Quantitative Kulturen	31
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Diskussion	36
1) Interpretation der Messergebnisse und Beurteilung der Methodik	36
2) Konsequenzen höherer Colistin-Konzentrationen in CMS-Lösungen	40
3) Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis.....	42
Anhang	i
1) Versuchsprotokoll.....	i
2) Messergebnisse.....	iii

ABKÜRZUNGEN

AUC:	Area Under the Curve
CFU:	Colony Forming Units
CMS:	Colistinmethansulfat
CTX-M:	Cefotaxim-Munich
CMY:	Cephamicinase
ECDC:	European Centre for Disease Prevention and Control
ESBL:	Extended Spectrum β -Lactamases
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GFR:	Glomeruläre Filtrationsrate
IDSA:	Infectious Diseases Society of America
KG:	Körpergewicht
KPC:	<i>Klebsiella-pneumoniae</i> -Carbapenemase
MHA:	Müller-Hinton-Agar
MHK:	Minimale Hemmkonzentration
NaCl:	Natriumchlorid
NDM- β -Lactamase:	New-Delhi-Metallo- β -Lactamase
OXA:	Oxacillinase
PBP:	Penicillin-bindendes Protein
RIFLE:	Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Renal Disease
SHV:	Sulfhydryl-variable
TEM:	Temoniera
VIM- β -Lactamase:	Verona-Integron-Metallo- β -Lactamase

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ausbreitung Carbapenemase-bildender Enterobakterien in Europa Anfang 2012; Quelle: Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2012 May;18(5):413-431	11
Abbildung 2: Prozentuales Auftreten von invasiven <i>Klebsiella-pneumoniae</i> -Isolaten in Europa; Quelle: European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Available at: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf . Accessed 09/10, 2013 ECDC, „Antimicrobial resistance surveillance report“, 2011, S. 28	13
Abbildung 3: Prozentuales Auftreten von multiresistenten invasiven <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -Isolaten in Europa; Quelle: European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Available at: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf . Accessed 09/10, 2013	14
Abbildung 4: Colistin und Polymyxin B; Quelle: Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? Diagn Microbiol Infect Dis 2012 Nov;74(3):213-223	18
Abbildung 5: Colistinmethansulfat; Quelle: Wallace SJ, Li J, Rayner CR, Coulthard K, Nation RL. Stability of colistin methanesulfonate in pharmaceutical products and solutions for administration to patients. Antimicrob Agents Chemother 2008 Sep;52(9):3047-3051	18
Abbildung 6: <i>Klebsiella oxytoca</i> ; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich	30
Abbildung 7: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich	30
Abbildung 8: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich	31
Abbildung 9: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe der Tadm-Lösungen [8mg/L]	33

Abbildung 10: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe der Tadm- Lösungen [32mg/L]	33
Abbildung 11: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe der Tadm- Lösungen [8mg/L]	34
Abbildung 12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe der Tadm- Lösungen [32mg/L]	35

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vereinfachte Übersicht der Einteilung der β -Lactamasen; in Anlehnung an: Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Menzel S, Ruth P. Therapie von Infektionskrankheiten. In: Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Menzel S, Ruth P, editors. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 10th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2013. p. 729-866; Brodt H. Eigenschaften der Antiinfektiva. In: Brodt H, editor. Antibiotika-Therapie. 12th ed. Stuttgart: Schattauer; 2013. p. 31-267; European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Available at: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance- surveillance-europe-2011.pdf . Accessed 09/10, 2013.....	11
Tabelle 2: Antibiogramm der ausgewählten Populationen.....	28
Tabelle 3: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; mittlere AUC	32
Tabelle 4: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; mittlere AUC	35
Tabelle 5: <i>Klebsiella oxytoca</i> , Plättchendiffusionstest; Messwerte.....	iii
Tabelle 6: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , Plättchendiffusionstest; Messwerte	iii
Tabelle 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Plättchendiffusionstest; Messwerte	iv
Tabelle 8: Plättchendiffusionstest; mittlere Zuwachsraten der Hemmhöfe.....	iv
Tabelle 9: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	iv
Tabelle 10: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	v
Tabelle 11: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	v
Tabelle 12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	v
Tabelle 13: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	vi
Tabelle 14: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , quantitative Kulturen; einzelne Messwerte	vi

ZUSAMMENFASSUNG

HINTERGRUND. Weltweit breiten sich neue Resistenzmechanismen immer rascher aus, gleichzeitig gibt es kaum Fortschritte in der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegenüber Infektionen mit gram-negativen Erregern. Dadurch werden die Polymyxine wie Colistin als Last-Line-Therapeutika immer wichtiger. Das zur Verfügung stehende Präparat Tadim[®] entwickelt erst durch die Hydrolyse seines Wirkstoffes Colistinmethansulfat (CMS) zu Colistin eine antibakterielle Wirkung. Ziel dieser Arbeit war, die antibakterielle Wirkung der gebrauchsfertigen Tadim[®]-Lösungen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit zu untersuchen.

METHODEN. Es wurden Plättchendiffusionstests mit jeweils multiresistenten *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Die Plättchen wurden mit jeweils 0, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden gelagerter Tadim[®]-Lösung beimpft. Zusätzlich wurden Kulturen von *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* mit NaCl bzw. mit Tadim[®]-Lösungen (8 und 32mg/L, sowohl frisch als auch 6h gelagert) gemischt und die Entwicklung der CFU/mL über einen Zeitraum von 24h untersucht.

ERGEBNISSE. Verglichen mit frischer Tadim[®]-Lösung ergaben Lagerungszeiten der Lösungen von 4 bis 6 Stunden erste signifikante Zunahmen der Hemmhöfe bei den Plättchendiffusionstests ($p < 0,05$). *P. aeruginosa*: Verglichen mit der Keim-NaCl-Suspension hatte nur die 6h gelagerte Tadim[®]-Lösung [32mg/L] eine signifikant geringere AUC ($p < 0,001$). *K. pneumoniae*: Es kam zu einem signifikanten CFU-Abfall nach bereits 2h ($p < 0,001$ verglichen mit 0h) mit gelagerter Tadim[®]-Lösung [32mg/L], bei frischer Tadim[®]-Lösung [32mg/L] dagegen erst nach 8h ($p < 0,01$ verglichen mit 2h).

ZUSAMMENFASSUNG. Die antibakterielle Wirkung der Tadim[®]-Lösungen erhöhte sich durch die Lagerungszeit. Durch die höhere Konzentration an präformiertem Colistin könnten allerdings vermehrt Nebenwirkungen auftreten, insbesondere Nephrotoxizität.

SCHLAGWÖRTER: Tadim, Colistin, Colistinmethansulfat, CMS, Polymyxine, Hydrolyse, gram-negative Bakterien, Multiresistenz.

ABSTRACT

BACKGROUND. New resistance mechanisms spread globally while new agents for infections caused by gram-negative bacteria are not to expect in the near future. Therefore the polymyxines like colistin have got more important as last-line antibiotics. The agent of Tadim[®] is colistin methanesulfonate (CMS) which needs to hydrolyse to colistin before it has antimicrobial activity. The aim of this study was to investigate the effect of storage time on the antimicrobial activity of the Tadim[®]-solutions.

METHODS. Disc diffusion tests were performed with *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, each of them multi-resistant. Blank paper discs were spiked with Tadim[®]-solutions which were stored for 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24h respectively. In addition suspensions of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were mixed with NaCl or Tadim[®]-solutions (8 and 32mg/L, freshly prepared and stored for 6h respectively) and then CFU-concentrations were examined during an incubation over 24h.

RESULTS. Disc diffusion tests: Compared to the freshly prepared Tadim[®]-solutions there were first statistical significant increases in the inhibition zones after a storage for 4 to 6 hours ($p < 0,05$). *P. aeruginosa*: A significant decrease in AUC was observed with Tadim[®]-solutions [32mg/L] stored for 6h ($p < 0,001$ vs. suspension with NaCl). *K. pneumoniae*: There was a decline in CFU/mL after 2h with the stored Tadim[®]-solutions [32mg/L] ($p < 0,001$ vs. 0h), with the freshly prepared solutions it took 8h ($p < 0,01$ vs. 2h).

CONCLUSION. The antibacterial activity of the Tadim[®]-solutions was improved by storage time. However, the preformed colistin might lead to more adverse effects, especially nephrotoxicity.

KEYWORDS: Tadim, colistin, colistin methanesulfonate, CMS, polymyxines, hydrolysis, gram-negative bacteria, multiresistance.

EINLEITUNG

Antibiotikaresistenzen stellen ein zunehmendes medizinisches Problem dar. Neue Resistenzmechanismen breiten sich international immer rascher aus. Nachdem z.B. erst 2009 in Indien die NDM- β -Lactamase entdeckt wurde, die zu nicht hemmbaren Resistenzen gegenüber sämtlichen β -Lactam-Antibiotika führt, wurde sie mittlerweile auf allen Kontinenten nachgewiesen. (1) Es werden zunehmend Ausbrüche von gram-negativen Bakterien beobachtet, die aufgrund ihrer Multiresistenzen nur noch mit einzelnen Reserveantibiotika wie den Polymyxinen therapierbar sind. (1,2) Gleichzeitig sind für die Bekämpfung gram-negativer Bakterien die Fortschritte in der Erforschung neuer Wirkstoffe nicht umfassend genug, um der voranschreitenden Ausbreitung der Multiresistenzen mit ausreichend Therapieoptionen zu begegnen. (1-3) So werden auch die Polymyxine wie Colistin eine immer wichtigere Last-Line-Therapieoption. (1,3-7) Das zur systemischen Therapie zur Verfügung stehende Colistinmethansulfat (= CMS, z.B. im Präparat Tadim[®] vorhanden) besitzt aber erst eine antibiotische Wirkung, wenn es in vitro oder in vivo wieder in seine Ausgangsstruktur Colistin hydrolysiert. (2) Die folgenden Kapitel dieser Einleitung sollen einen Überblick über die problematische Therapie von Infektionen durch multiresistente gram-negative Bakterien und den dabei in den Fokus rückenden Wirkstoff Colistin bzw. Colistinmethansulfat geben.

1) Einteilung und Entstehung von Antibiotikaresistenzen

Die Wirksamkeit eines Antibiotikums kann über mehrere Mechanismen herabgesetzt werden. Das Antibiotikum an sich kann inaktiviert werden, indem seine Struktur durch Enzyme entweder zerstört oder durch hinzugefügte chemische Gruppen so verändert wird, dass es keinen ausreichenden Einfluss mehr auf die Zielstruktur nehmen kann. (8) Eine weitere Möglichkeit ist, das Ziel des Wirkstoffes zu modifizieren. Durch eine geänderte Zielstruktur kann sich folgend die Bindung des Antibiotikums und damit seine Wirkung verschlechtern. (8) Doch statt auf Strukturen kann das Bakterium auch Einfluss auf die Konzentrationen des Wirkstoffes am Wirkort nehmen. Zum Beispiel kann der eingedrungene Wirkstoff wieder aus der Zelle heraus geschafft werden, bevor er seine Wirkung entfalten kann. (8) Zu einer vermehrten Ausscheidung führt die Entwicklung von Efflux-Pumpen, sodass am Wirkort keine ausreichende Konzentration erreicht wird, die für

einen antibakteriellen Effekt nötig wäre. (8) Diese Efflux-Pumpen können spezifisch für eine bestimmte Strukturgruppe arbeiten und sind sowohl bei gram-positiven als auch bei gram-negativen Bakterien zu finden. (8) Bei gram-negativen Bakterien findet man neben den spezifischen aber auch noch sogenannte Multidrug-Efflux-Pumpen, welche unspezifisch eine Vielzahl an Wirkstoffen mit unterschiedlichen Strukturen wieder aus der Zelle abtransportieren können, mit der Folge einer ausgeprägten Multiresistenz. (8) Gram-negative Bakterien haben aber nicht nur eine besondere Möglichkeit, Wirkstoffe wieder hinaus zu schleusen, sondern können auch die Aufnahme der Wirkstoffe zu verringern. Bei ihnen müssen die Antibiotika zuerst die äußere Zellmembran überwinden, sodass eine Strukturänderung der Porine dieser Membran in der Folge zu einer verringerten Aufnahme des Antibiotikums führen kann. (9)

Unter der Therapie entstehende sekundäre Antibiotikaresistenzen bilden sich entweder rasch durch die Mutation eines einzigen Gens oder aber langsam durch Kumulation mehrerer Mutationen im bakteriellen Genom. (9) Vorhandene Resistenzen können dann an andere Bakterien weitergegeben werden. Befinden sie sich auf extrachromosomaler DNA, also in Form von Plasmiden, Transposons oder Genkassetten, können diese per Konjugation speziesübergreifend verbreitet werden. (9) Da besonders die Plasmide oft mehrere Resistenzgene gegen verschiedene Antibiotika beinhalten (v.a. inaktivierende Enzyme oder Effluxpumpen), werden auf diese Weise leicht Multiresistenzen weitergegeben. (10) Dieser horizontale Gentransfer über Konjugation ist der verbreitetste Mechanismus (10), besonders bei den gram-negativen Stäbchen. (11) Innerhalb einer Spezies können DNA-Abschnitte mit Resistenzinformationen auch per Phagen in Form der Transduktion weitergereicht werden. (9) Daneben können manche Bakterien zusätzlich freie DNA-Fragmente mit Informationen für Resistenzen aufnehmen und in ihr Genom einbinden. (9) So kumulieren mit der Zeit mehrere Resistenzmechanismen in den Bakterien, welche dann unter dem Einsatz der gegen sie wirkungslosen Antibiotika einen Selektionsvorteil genießen und sich gegenüber den empfindlichen Populationen durchsetzen. (9)

2) Resistenzmechanismen gegenüber den wichtigsten Antibiotikagruppen bei Infektionen gram-negativer Erreger

Im folgenden Abschnitt werden die Resistenzmechanismen gegen β -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside und Fluorchinolone näher betrachtet. Diese Substanzklassen werden gegen gram-negative Bakterien üblicherweise eingesetzt.

2.1. Resistenzmechanismen gegenüber β -Lactam-Antibiotika

Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika bilden sich über die Strukturänderung der Penicillin-bindenden Proteine (PBP; z.B. Transpeptidasen), über die Synthese von β -Lactamasen oder bei gram-negativen Bakterien über die Veränderung der Porine der äußeren Zellmembran. (9) Im ersten Fall produzieren die Bakterien strukturell veränderte Transpeptidasen zur Mureinhüllensynthese, bei denen die β -Lactam-Antibiotika weniger stark binden und die Aktivität dieser Transpeptidasen nicht mehr ausreichend beeinflussen. (9) Dies ist besonders bei gram-positiven Kokken von Bedeutung, wo dieser Vorgang zur Ausbildung der MRSA-Stämme führt. (9) Bei den in dieser Arbeit betrachteten gram-negativen Stäbchen sind aber vor allem die zweite und dritte Variante von Bedeutung. Die Synthese von β -Lactamasen führt zur Zerstörung der β -Lactam-Struktur mittels Hydrolyse (12), was eine unterbleibende Bindung an die PBP zur Folge hat. Dieser Resistenzmechanismus ist bzgl. der β -Lactam-Antibiotika am häufigsten anzutreffen (13), er ist üblicherweise auf Plasmiden enthalten. (4) Die β -Lactamasen sind sehr vielfältig in ihrer Struktur und Substratauswahl, derzeit gibt es über 250 bekannte Varianten. (4) Bezüglich der Struktur kann man sie grob in Serin- β -Lactamasen (mit einem Serin-Rest im aktiven Zentrum) und Metallo- β -Lactamasen (mit einem Zink-Atom im aktiven Zentrum) unterteilen, eine weitere Unterteilung nach der Struktur erfolgt nach Ambler in vier Klassen. (9) Daneben können sie anhand ihrer Substrate eingeteilt werden (Tab. 1). (9) Breitspektrum- β -Lactamasen hydrolysieren die Breitspektrum-Penicilline und die Cephalosporine der Gruppen 1 und 2¹. (4,9,12) Sie gehören meist dem TEM- oder SHV-Typ an. (4,9) Varianten dieser Typen können ein erweitertes Substratspektrum besitzen, welches dann auch Cephalosporine der Gruppen 3 und evtl. 4², sowie Monobactame umfassen kann. (4,9) Solche β -Lactamasen werden dann extended-spectrum β -lactamases (ESBL) genannt. (4,9) Darunter fallen z.B. die CTX-M-Typen, die derzeit die häufigsten

¹ z.B. Cefazolin (Gr. 1); Cefuroxim (Gr. 2)

² z.B. Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim (Gr. 3); Cefepim (Gr. 4)

ESBL sind. (4,9) Die AmpC- β -Lactamasen führen zu einer Resistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen, bis auf Cefepim. (9) Die Carbapenemasen mit Serin-Rest verursachen Resistenzen gegen sämtliche β -Lactam-Antibiotika, ebenso auch Carbapenemasen mit Zink-Atomen (= Metallo- β -Lactamasen). (9) Oxacillinasen führen zu einer Resistenz gegen Penicilline inkl. Oxacillin, manche Typen schließen auch Carbapeneme und die Cephalosporine ein. (4,9,12) β -Lactamasen der Ambler-Klasse A sind noch durch β -Lactamase-Inhibitoren hemmbar, ausgenommen von dieser Aussage sind die Klasse-A-Carbapenemasen mit variabler Hemmbarkeit und einzelne andere (s. Tab. 1); nicht hemmbar sind dagegen derzeit die AmpC- β -Lactamasen und die Metallo- β -Lactamasen, die Oxacillinasen ebenfalls nur bedingt. (4,9,12) Immer häufiger produzieren Bakterien nicht nur eine, sondern mehrere verschiedene β -Lactamasen. (4) Zusätzlich besitzen sie oft gleichzeitig noch Resistenzen gegen andere, nicht- β -Lactam-Antibiotika, was besonders bei Carbapenemase-bildenden Bakterien problematisch ist, da dies die therapeutischen Optionen sehr stark einschränkt. (5)

In Europa sind Carbapenemasen derzeit vor allem bei den Enterobakterien (Abb. 1), in dieser Gruppe besonders bei der Spezies *Klebsiella pneumoniae*, sowie bei den Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* verbreitet. (5) Die Häufigkeit der einzelnen Carbapenemasen ist zwischen den Regionen in Europa sehr unterschiedlich. Nach einer Erhebung unter Experten von Glasner et al. ist insbesondere die KPC europaweit am verbreitetsten, in Österreich findet sich nach diesem Bericht die VIM- β -Lactamase am häufigsten. (6) Nach Canton et al. spielen auch die OXA-48 und NDM- β -Lactamase eine Rolle. (5) In den meisten Fällen waren dabei die Stämme nosokomial erworben. (5) Die Häufigkeit der Fälle mit ambulant erworbenen Carbapenemase-bildenden Stämmen scheint zwar noch selten, nimmt aber zu. (5) Die Suche und Entwicklung von Inhibitoren für Metallo- β -Lactamasen ist derzeit Gegenstand der Forschung, aber die sehr vielseitigen Strukturen dieser β -Lactamasen sind dabei eine große Herausforderung. (14) Bis zu einem möglichen Einsatz im klinischen Alltag wird es noch einige Zeit dauern. (14)

Zusätzlich zu den β -Lactamasen können die gram-negativen Bakterien, wie oben beschrieben, die in der äußeren Membran vorhandenen Porine in ihrer Struktur oder Anzahl verändern. Die β -Lactam-Antibiotika werden dann daran gehindert, in ausreichendem Maße in den periplasmatischen Raum zu diffundieren, und dort die Transpeptidasen an der inneren Zellmembran zu hemmen. (9)

Ambler-Klasse	β -Lactamasen	Resistenz gegen	β -Lactamasen-Inhibition möglich
A	Penicillinasen	Penicilline	ja (Ausnahmen)
	Cephalosporinasen	Cephalosporine	ja (Ausnahmen)
	Breitspektrum- β -Lactamasen (z.B. TEM-1, SHV-1)	Penicilline, Cephalosporine Gruppe 1 und 2	ja
	ESBL (z.B. TEM-3, SHV-2, CTX-M)	Penicilline, Cephalosporine (mind. Gruppe 1-3)	ja
	Carbapenemasen (z.B. KPC)	alle β -Lactame	variabel
B	Carbapenemasen (z.B. VIM, NDM)	alle β -Lactame	nein
C	AmpC- β -Lactamasen (z.B. CMY)	Penicilline, Cephalosporine (außer Cefepim)	nein
D	Oxacillinasen (OXA)	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme	variabel
Anm.: Klassen A, C und D sind Serin- β -Lactamasen, B sind Metallo- β -Lactamasen			

Tabelle 1: Vereinfachte Übersicht der Einteilung der β -Lactamasen (in Anlehnung an: Mutschler et al., 2013, S. 743; Brodt, 2013, S. 55-56; ECDC, „Antimicrobial resistance surveillance report“, 2011)

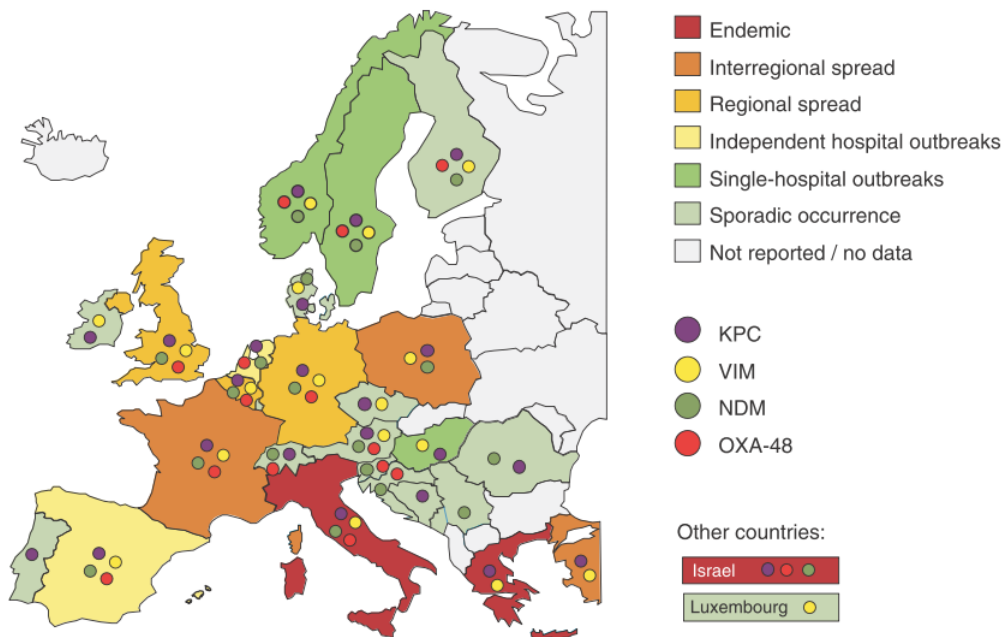


Abbildung 1: Ausbreitung Carbapenemase-bildender Enterobakterien in Europa Anfang 2012; Quelle: Canton et al., 2012, S. 415

2.2. Resistenzmechanismen gegenüber Aminoglykosiden

Für die Aminoglykoside bilden die bakteriellen Ribosomen die Zielstruktur. Resistenzen gegen diese Wirkstoffklasse können durch Änderungen an den Bindungsstellen am Ribosomen entstehen, z.B. durch Methylierungen. (4,9) Der verbreitetste Resistenzmechanismus gegen diese Wirkstoffgruppe ist aber die Bildung von Acetyl-, Adenyl- oder Phosphotransferasen, die die entsprechenden chemischen Gruppen an den Wirkstoff addieren und so dessen Aktivität vermindern. (4,13) Porin-Veränderungen bei gram-negativen Bakterien oder die Synthese von Efflux-Pumpen können auch hier die Aufnahme vermindern bzw. die Ausscheidung erhöhen. (9)

2.3. Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen

Die dominierenden Resistenzmechanismen gegen Fluorchinolone sind die Porin-Veränderungen sowie die Efflux-Pumpen mit folgender verminderter Aufnahme bzw. erhöhter Ausscheidung des Wirkstoffes. (13) Aber auch die A-Untereinheit der bakteriellen Topoisomerasen als Zielstruktur der Fluorchinolone kann sich durch schrittweise anhäufende chromosomale Mutationen verändern. (4,9) Dazu kommen zwei weitere, über Plasmide vermittelte Möglichkeiten. (4,9) So können spezielle Proteine produziert werden, sogenannte Qnr-Proteine, die die Wirkung der Fluorchinolone an den Topoisomerasen unterbinden. (4,9) Auch wurde die Synthese von N-Acetyltransferasen nachgewiesen, die den Wirkstoff inaktivieren können. (4,9)

3) Spezielle gram-negative Keime

Die Bakterienarten, die durch ihre Multiresistenzen momentan besondere Probleme bereiten und deren Infektionen mit einer deutlichen Steigerung der Morbidität und Mortalität einhergehen, sind die sogenannten „ESKAPE“-Pathogene. (3) Dies sind im gram-positiven Bereich die Arten *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus*, im gram-negativen Bereich *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und die *Enterobacter spp.* (3) In diesem Abschnitt werden diese gram-negativen Keime kurz vorgestellt, da Colistin für sie ein potentiell Last-Line-Antibiotikum darstellt. Im Besonderen wird dabei auf die im Experiment verwendeten *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Chryseobacterium indologens* eingegangen.

3.1. Klebsiella spp. und Enterobacter spp.

Klebsiella spp. und *Enterobacter spp.* gehören zu den Enterobakterien und kommen natürlicherweise im Intestinaltrakt vor. (15) Typischerweise manifestieren sich die Infektionen als Pneumonien, Gallenwegsinfektionen, Peritonitiden, Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen und Sepsen. (15,16) Infektionen sind üblicherweise Autoinfektionen, seltener Fremdinfektionen z.B. durch Inhalatoren. (17) In der Regel bilden *K. pneumoniae* SHV- β -Lactamasen, mit resultierenden Resistenzen gegenüber Penicillinen und oft auch Cephalosporinen. (15,17) Ebenfalls häufig anzutreffen sind Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden und Fluorchinolonen, oft sind auch mehrere Resistenzen kombiniert. (4) Die Resistenzraten schwanken innerhalb der EU stark (Abb. 2) und sind tendenziell steigend. (4) Auch Carbapenemase-bildende Stämme breiten sich zunehmend aus (18), im Mittelmeerraum sind diese bereits endemisch in Krankenhäusern vertreten. (17) Als einzig verlässliche therapeutische Option bei Infektion mit einer solchen multiresistenten *Klebsiella*-Population bleibt oft nur noch Colistin in Kombinationstherapie (s. Kapitel 5.1). (17) *Enterobacter spp.* bilden ebenso wie die *Klebsiella spp.* häufig β -Lactamasen, insbesondere ESBL und die nicht hemmbaren AmpC- β -Lactamasen, womit ausgeprägte Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen einhergehen. (16,17)

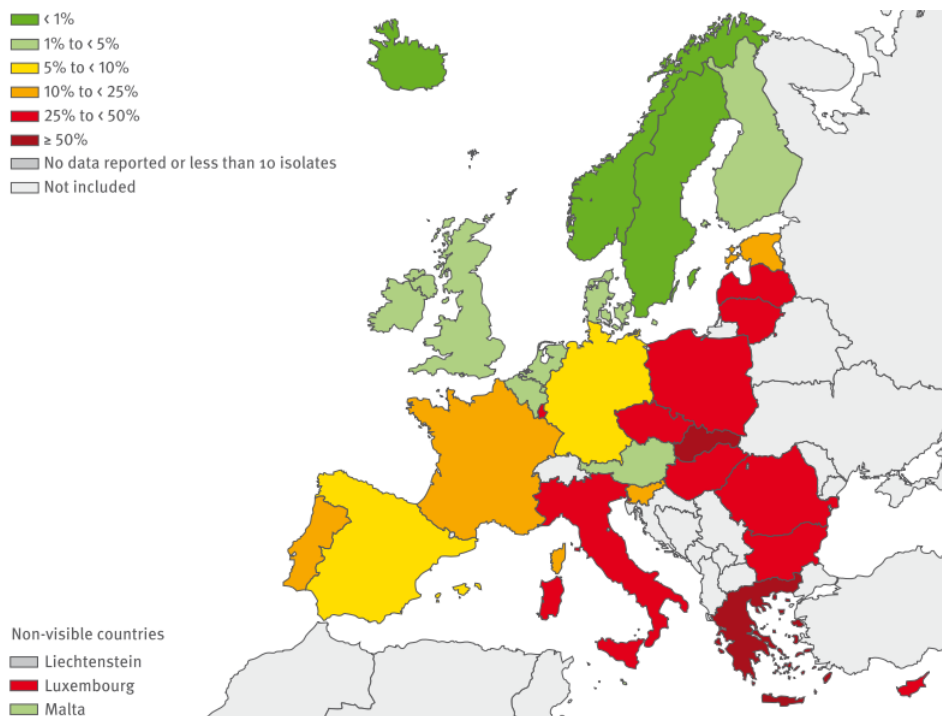


Abbildung 2: Prozentuales Auftreten von invasiven *Klebsiella-pneumoniae*-Isolaten in Europa (Stand 2011) mit gleichzeitiger Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation, Fluorchinolonen und Aminoglykosiden; Quelle: ECDC, „Antimicrobial resistance surveillance report“, 2011, S. 28

3.2. Pseudomonas spp.

Wichtigster Vertreter der *Pseudomonas spp.* ist *P. aeruginosa*. (19) *P. aeruginosa* kommt von Natur aus im Boden und Wasser vor. (19) Da diese Spezies aber sehr anspruchslos ist, findet man sie ubiquitär, z.B. auch auf Lebensmitteln oder sogar in Seifen oder Desinfektionsmitteln. (19) Sie ist leicht übertragbar, vor allem die Beatmung ist ein häufig beobachteter Übertragungsweg. (17) Zu Infektionen kommt es bei lokaler Abwehrschwäche oder systemisch geschwächtem Immunsystem, die verursachten Krankheitsbilder sind sehr unterschiedlich und erstrecken sich von Sepsen über Pneumonien, Infektionen des Harntraktes, der Augen, Otitiden, Meningitiden, Osteomyelitiden, Endokarditiden bis hin zu Wundinfektionen. (19) *P. aeruginosa* ist häufig multiresistent, selbst Desinfektionsmittel können durch eine Multidrug-Efflux-Pumpe vermindert wirksam sein. (17,20) Natürliche Resistenzen liegen gegen die meisten Penicilline und Cephalosporine vor. (19) Einsetzbare β -Lactam-Antibiotika sind Acylaminopenicilline mit β -Lactamasehemmern, Cephalosporine der Gruppe 3 und 4, Monobactame und Carbapeneme mit Ausnahme des Ertapenem (9,19,21). Bei allen zur Verfügung stehenden Wirkstoffen muss aber mit Resistenzraten von bis zu 10% bis 30% gerechnet werden. (17) Das Auftreten resistenter invasiver Stämme von *P. aeruginosa*

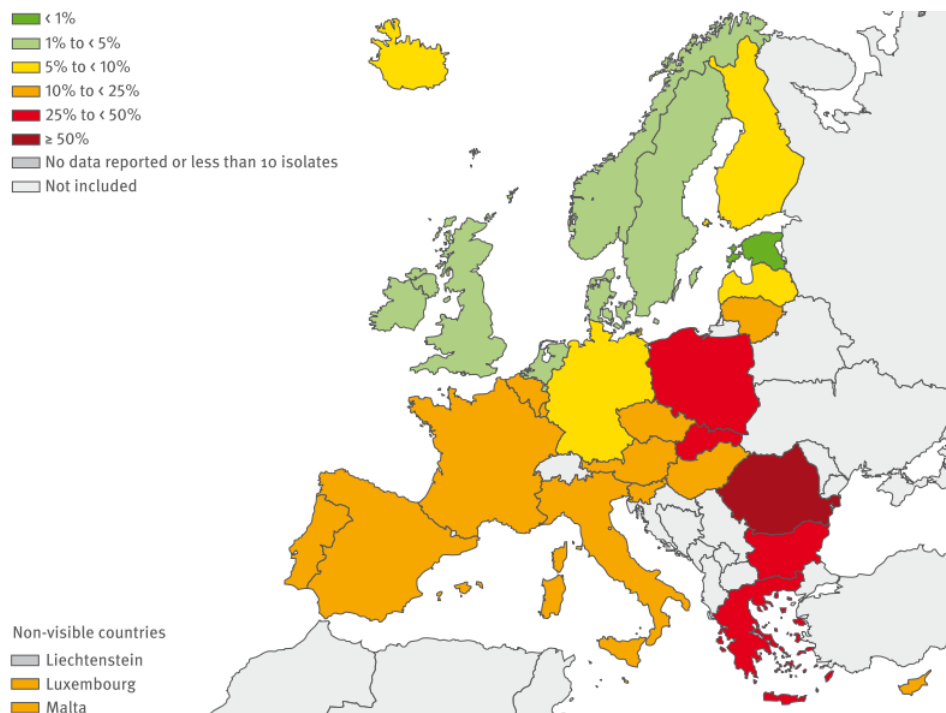


Abbildung 3: Prozentuales Auftreten von multiresistenten invasiven *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolaten in Europa (Stand 2011; Resistenzen gegenüber mind. drei Antibiotikaklassen); Quelle: ECDC, „Antimicrobial resistance surveillance report“, 2011, S. 40

innerhalb der EU (Abb. 3) scheint zwischen 2008 und 2011 insgesamt stabil geblieben zu sein. (4) Es haben sich aber mittlerweile multiresistente Stämme herausselektiert, die gegen alle bekannten Wirkstoffe Resistenzen entwickelt haben. (10) Resistenzbildungen treten vor allem unter längerdauernder antibiotischer Therapie wie auf Intensivstationen oder bei zystischer Fibrose auf. (17)

3.3. Acinetobacter spp.

Acinetobacter spp. kommen nahezu ubiquitär vor und treten vor allem als opportunistische Erreger im Rahmen nosokomialer Infektionen auf, insbesondere Katheter-assoziiert. (16,19) Der häufigste klinisch relevante Vertreter dieser Spezies ist *A. baumannii*. (19) Typische Krankheitsbilder sind Pneumonien, Bakteriämien bis Sepsen, Endokarditiden, Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen und postoperative Infektionen. (16,19) Bei Wundinfektionen der stationierten Soldaten in Afghanistan und Irak sind die *Acinetobacter spp.* mittlerweile die häufigsten Erreger. (16,19) Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika werden häufig beobachtet. (16,19) Auch hier hat, wie bei der *Pseudomonas spp.*, das Carbapenem Ertapenem keine Wirkung (9), primäre Resistenzen gibt es daneben auch gegen ältere Fluorchinolone wie Norfloxacin und das Last-Line-Antibiotikum Fosfomycin. (16)

3.4. Chryseobacterium spp.

Chryseobacterium indologens ist der häufigste klinisch nachweisbare Erreger dieser Art, aber nur selten klinisch relevant. (19) Die *Chryseobacterium spp.* kommen im Boden, auf Pflanzen und im Wasser natürlich vor. (19) Auch sie sind relativ widerstandsfähig und können z.B. auch in gechlortem Leitungswasser gedeihen. (21) Meist werden sie über kontaminierte medizinische Produkte und Flüssigkeiten übertragen, häufig mit folgender Besiedlung des Respirationstraktes z.B. nach Inhalationstherapie. (19,21) Bei abwehrgeschwächten Patienten kann es dann v.a. zu Pneumonien und Bakteriämien kommen, bei *C. meningosepticum*, einem weiteren Vertreter dieser Art, auch zu gefährlichen Meningitiden. (19,21) *Chryseobacterium spp.* bilden häufig β -Lactamasen, was zu Resistenzen bis inkl. der Carbapeneme führt, und sind auch oft gegenüber Aminoglykosiden resistent. (19,21)

4) Therapie von Infektionen durch multiresistente gram-negative Bakterien

4.1. Last-Line-Antibiotika gegen gram-negative Erreger

Stehen keine β -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside oder Fluorchinolone mehr zur Anwendung gegen gram-negative Bakterien zur Verfügung, bleiben nur noch wenige therapeutische Optionen. Besonders die Polymyxine wie Colistin zeigen sich dann noch als verlässlich wirkungsvoll, daneben Fosfomycin und Tigecyclin. (3,7) Colistin wird im entsprechenden Kapitel näher beschrieben. Es ist gerade bei den sich immer weiter ausbreitenden NDM- β -Lactamase-bildenden multiresistenten Keimen wichtig, welche oft nur noch Sensibilität gegenüber den Polymyxinen aufweisen. (1)

Tigecyclin ist ein Glycylcyclin, was wiederum eine Untergruppe der Tetracycline ist. (9) Es unterbindet die Bindung der tRNA an die bakteriellen Ribosomen und hemmt so die Proteinsynthese des Erregers. (9) Tigecyclin hat eine eingeschränkte Wirkung gegenüber gram-negativen Bakterien. Erfasst werden u.a. Enterobakterien und die *Acinetobacter spp.* (12) Gegenüber z.B. *P. aeruginosa* und den Enterobakterien der *Proteus spp.* und *Morganella morganii* hat es aber keine verlässliche Wirkung, ursächlich dafür sind durch einfache Punktmutationen leicht aktivierbare Multidrug-Effluxpumpen. (12)

Fosfomycin ist strukturell mit keinem anderen Antibiotikum vergleichbar. (12) Es hemmt die Enol-Pyruvat-Transferase und damit schon vor der Angriffsebene der β -Lactam-Antibiotika die Mureinsynthese. (12) Ein Teil des gram-negativen Erregerspektrums wird durch Fosfomycin erfasst, so z.B. die Enterobakterien *E. coli*, *P. mirabilis*, die *Salmonella spp.* und die *Shigella spp.* (12) Aber auch Fosfomycin hat im gram-negativen Bereich Wirkungslücken. Es besteht bei diesem Wirkstoff generell die Möglichkeit schneller Resistenzentwicklungen unter Therapie, und die *Acinetobacter spp.* und Enterobakterien *M. morganii*, *K. pneumoniae* und *Enterobacter spp.* sind häufig schon vor Therapiebeginn resistent. (12)

4.2. Momentaner Stand der Entwicklung neuer Antibiotika gegen das gram-negative Erregerspektrum

Trotz der zunehmenden Ausbildung und Ausbreitung von Resistenzen gerade bei den gram-negativen Erregern gibt es für diese nur bescheidene Entwicklungen bei der Zulassung neuer Antibiotika. Seit dem letzten Report der IDSA aus dem Jahre 2009 zum

Stand der Entwicklung neuer Antibiotika wurde in den USA nur eine neue Wirksubstanz für die Therapie von Infektionen mit gram-negativen Bakterien zugelassen, das Ceftarolininfosamil aus der Gruppe der Cephalosporine. (3,22) In Studienphase 2 oder 3 befinden sich derzeit nur 7 weitere Wirkstoffe, davon 4 Kombinationen aus β -Lactam-Antibiotikum plus β -Lactamase-Hemmer, wobei diese Inhibitoren keine Wirkung gegen Metallo- β -Lactamasen besitzen. (3) Zwei weitere Wirkstoffe, ein Aminoglykosid und ein Tetracyclin, hemmen die Proteinsynthese und sind auch wirksam bei Resistenzmechanismen gegenüber diesen Wirkstoffgruppen. (3) Allerdings haben sie nur begrenzte bis keine Wirkung bei *P. aeruginosa* und der *Acetivobacter spp.* (3) Dazu kommt noch ein Wirkstoff, der ein Defensin imitiert und zur Schädigung der bakteriellen Zellwand führt. (3) Dieser weist aber ebenfalls keine Aktivität gegen *A. baumannii* auf, und auch die Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* ist noch nicht bekannt. (3) Außerdem beziehen sich diese Studien nur auf Harnwegsinfektionen, intraabdominelle Infektionen oder Hautinfektionen, nicht aber auf die Anwendung bei anderen, ebenfalls wichtigen Krankheitsbildern wie Pneumonien oder Bakteriämien. (3)

5) Colistin

5.1. Überblick und Anwendungsbereiche

Colistin gehört zur Gruppe der Polymyxine, wo es dem Polymyxin E entspricht. (12) Genauer betrachtet ist mit Colistin immer ein Gemisch aus mehreren ähnlichen Strukturen gemeint, davon sind die häufigsten Colistin A und B bzw. Polymyxin E1 und E2. (1,23) Colistin gilt als Last-Line-Antibiotikum bei Infektionen mit multiresistenten gram-negativen Bakterienstämmen, wenn alle anderen Möglichkeiten ausgeschöpft sind. Seine ausschließliche Wirksamkeit gegen gram-negative Bakterien ist durch den Wirkmechanismus bedingt (s.u.). (12,23)

Colistin (Abb. 4) wird in zwei Formen zur Verabreichung angeboten, als Colistinsulfat oder Colistinmethansulfat. (12,23) Colistinsulfat ist das Sulfat-Salz von Colistin, in dieser Form wird es lokal bei Infektionen im HNO-Bereich, des Auges und der Haut und oral zur Darmdekontamination eingesetzt. (12,23) Systemisch oder zur Inhalation wird Colistinmethansulfat verwendet (= CMS (Abb. 5); dessen Natrium-Salz wird auch Colistimethat-Natrium genannt). (12,23) Indikationen zur Inhalationstherapie sind z.B.

schwere Pneumonien und die Infektionsprophylaxe bei chronischen Atemwegserkrankungen wie Mukoviszidose. (12,23) Colistin, Colistinsulfat und CMS haben unterschiedliche molekulare Massen, nämlich jeweils ca. 1163 g/mol, 1403 g/mol bzw. 1743 g/mol. (24) Die im Folgenden erläuterten Heteroresistenzen, die geringe Transformation des Prodrugs CMS zum wirksamen Colistin und die dosisabhängige Toxizität führen zu der Empfehlung, Colistin systemisch vorwiegend in Kombinationstherapie einzusetzen. (12,23) Insbesondere die Kombination mit Rifampicin scheint mit einem verbesserten klinischen Ergebnis verbunden zu sein. (23)

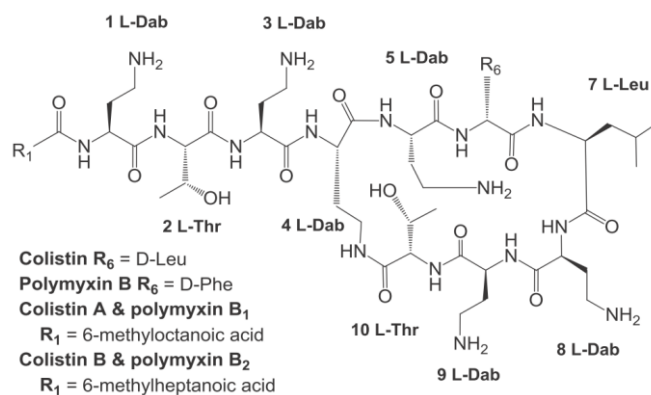


Abbildung 4: Colistin und Polymyxin B; α,γ -Diaminobuttersäure = Dab, Leucin = Leu, Threonin = Thr, Phenylalanin = Phe; Quelle: Bergen et al., 2012, S. 214

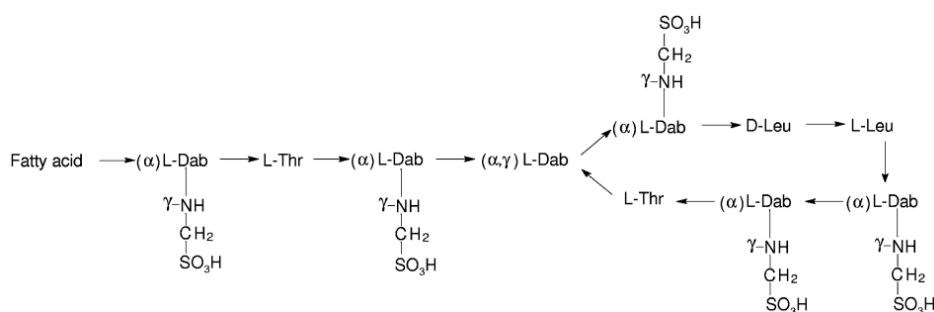


Abbildung 5: Colistinmethansulfat; α,γ -Diaminobuttersäure = Dab, Leucin = Leu, Threonin = Thr; Quelle: Wallace et al., 2008, S. 3048

5.2. Chemische Eigenschaften und Wirkmechanismus

Colistin ist ein amphiphiles zyklisches Polypeptid mit einem Fettsäurerest (Abb. 4). (1,23) Die Diaminobuttersäurereste sind bei physiologischem pH-Wert positiv geladen und daher hydrophil. (1) Der Fettsäurerest und zwei weitere Reste innerhalb der Ringstruktur (Abb. 4: Positionen 6 und 7) sind hydrophob. (1) Diese Eigenschaften sind wichtig für den später erläuterten Wirkmechanismus. Bei physiologischem pH-Wert liegt Colistin als Kation, CMS (Abb. 5) dagegen aufgrund seiner kovalent an die Diaminobuttersäure gebundenen Methansulfat-Gruppen als Anion vor. (1,23) CMS ist weniger toxisch als Colistin, es zeigte sich aber, dass es nur das Prodrug zu Colistin ist und selbst keine antibakterielle Wirkung hat. (2) Unter Anwesenheit von Wasser spalten sich die Methansulfat-Gruppen durch Hydrolyse ab, wodurch in unterschiedlichem Maße sulfomethylierte Colistin-Derivate bis hin zu nicht-sulfomethyliertem Colistin entstehen. (2) Letzteres führt dann zu einer entsprechenden antibakteriellen Aktivität. (2,12,23) Wallace et al. haben in einer Studie die Bildung von Colistin in gebrauchsfertigen Lösungen des CMS-Präparates Colymycin M näher untersucht. (25) In einer Lösung mit Wasser mit einer Konzentration von 200 g/L wandelte sich innerhalb von 7 Tagen nur 0,1% des CMS zu Colistin um, sowohl bei 4°C als auch 25°C. (25) Ein Teil dieser Lösungen wurde mit 5%-iger Glucoselösung, ein anderer mit 0,9%-iger NaCl-Lösung auf 4 g/L weiter verdünnt und wiederrum gelagert. (25) Nach 48 Stunden hatte sich eine Colistinmenge bei 4°C von < 0,3% bzw. bei 25° von < 4% der ursprünglichen CMS-Menge gebildet. (25) Eine andere Studie zeigte bei 37°C eine Umwandlung nach 4 Stunden von ca. 30% bei 20 mg/L CMS bzw. nach 48 Stunden von bis zu 80% bei Lösungen mit 20 mg/L und 100 mg/L CMS. (25) Auch bei Bergen et al. waren 30% des CMS nach 4 Stunden bei Konzentrationen von 8 bzw. 32 mg/L bei 37°C zu Colistin umgesetzt. (2) Angemerkt werden muss dabei, dass sich diese Prozentangaben auf komplett zu Colistin hydrolysiertes CMS beziehen und nur teilweise hydrolysiertes CMS in Form von partiell sulfomethylierten Derivaten nicht direkt nachgewiesen werden kann. (25) Zu diesem Punkt gibt aber die Untersuchung einer anderen Lösung Informationen. Eine CMS-Lösung zur Inhalation in der Konzentration von 77,5 g/L wurde für 52 Wochen bei sowohl 4°C als auch 25°C gelagert und auf gebildetes Colistin hin untersucht. (25) Es zeigte sich, dass bei beiden Temperaturen nur < 0,1% des CMS zu Colistin hydrolysiert wurden. (25) Bei dieser Lösung wurde auch die Osmolalität kontrolliert, welche stabil blieb. (25) Dies bedeutet, dass sich keine nur teilweise sulfomethylierten Derivate gebildet haben, da diese eine osmotische Aktivität ausüben

müssten. (25) Aus diesen Untersuchungen zeigt sich also neben der Temperaturabhängigkeit der CMS-Hydrolyse auch eine Konzentrationsabhängigkeit. (25) CMS hydrolysiert also je schneller, desto höher die Temperatur und desto geringer die Konzentration ist. (25) Als Grund für die Konzentrationsabhängigkeit der Hydrolyse wird die Amphiphilie von CMS angenommen. (26) Es konnte gezeigt werden, dass sich ab einer bestimmten CMS-Konzentration in wässriger Lösung Mizellen bilden. (26) Dadurch sind die Methansulfat-Gruppen vor der Hydrolyse geschützt und CMS bleibt stabil. (26) Ab einer CMS-Konzentration von 3,5 mmol/L (ca. 6,1 g/L) bzw. einer Colistin-Konzentration von 1,5 mmol/L (ca. 1,7 g/L) tritt diese Mizellenbildung auf. (26)

Colistin wirkt bakterizid auf extrazelluläre Bakterien. (12) Die Wirkung ist konzentrationsabhängig, der postantibiotische Effekt ist sehr gering. (23) Der Wirkmechanismus im Detail ist unbekannt, aber der grundlegende Vorgang ist folgender: An der äußeren Membran gram-negativer Bakterien wirkt Colistin als oberflächenaktive Substanz. (1,23) Es verdrängt die zweiwertigen Kationen Magnesium und Calcium und wechselwirkt dann selbst als Kation elektrostatisch mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Lipid A der Lipopolysaccharide. (27) Gleichzeitig interagiert es auch mit seinem Fettsäurerest und den hydrophoben Resten des Ringes mit den Lipidkomponenten der Bakterienmembran. (1,23) Es folgt eine gesteigerte Permeabilität der äußeren Membran, die Diffusion des Colistin zur inneren Membran und in der Folge der nun auch dort steigenden Permeabilität zu einem Verlust von Zellinhalten und der Zerstörung des Bakteriums. (1,23) Neben dem antibakteriellen Effekt scheinen Polymyxine noch eine Aktivität gegen Endotoxine gram-negativer Bakterien zu besitzen. (23)

5.3. Resistenzmechanismus

Resistenzen gegen Colistin bilden sich unter Therapie nur selten und langsam. (12,23) Es besteht dann eine Kreuzresistenz zum Polymyxin B, welches sich nur durch eine Aminosäure vom Colistin unterscheidet (Abb. 4). (12,23) Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotikagruppen existieren nicht. (28) Die Art und Weise, wie Resistenzen gegenüber Colistin entstehen, ist im Detail noch nicht sicher geklärt. (1) Der wichtigste Vorgang dabei ist die Modifikation der Lipopolysaccharide. (1) Ersetzt ein Bakterium an seiner äußeren Membran die Phosphatgruppen der Lipopolysaccharide durch

Phosphoethanolamin oder Aminoarabinose, so wird die negative Ladung durch eine positive ersetzt und fehlt als Angriffspunkt, sodass Colistin nur noch reduziert wirksam ist. (1,23,28) Dies wurde u.a. bei *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *A. baumannii* beobachtet. (1) Stämme von *A. baumannii* zeigen auch den vollständigen Ersatz der Lipopolysaccharide. (1,28,29) In diesem Zuge wurde eine vermehrte Genexpression bzgl. Synthese und Transportmechanismen von Phospholipiden, Lipoproteinen und Acetylglucosaminen zur Stabilisierung der äußeren Membran beobachtet. (1,28,29) Neben diesen beiden Mechanismen werden noch mehrere andere, oft speziesspezifische, Veränderungen diskutiert, über die hier nur ein Überblick anhand zweier Beispiele gegeben werden soll. So produzierten z.B. *P. aeruginosa* entsprechende Efflux-Pumpen gegenüber Polymyxinen. (1) Manche Mechanismen involvieren auch verschiedenste Modifikationen anderer Membranstrukturen. Als Beispiel seien hier Stämme von *Burkholderia multivorans* aufgeführt, wo eine erhöhte Polymyxin-Sensibilität im Zusammenhang mit dem Verlust von membranstabilisierenden Strukturen, den Hopanoiden, beobachtet wurde, was den Umkehrschluss nahe legt, dass eine vermehrte Bildung dieser Hopanoide Resistenzen innerhalb der *Burkholderia spp.* erklären könnte. (1)

Die Sensibilitätsgrenze für Colistin liegt derzeit laut EUCAST bei $\leq 2\text{mg/L}$ für Enterobakterien, für Pseudomonaden bei $\leq 4\text{mg/L}$. (28,30) Resistente gram-negative Bakterien sind Meningokokken, Gonokokken, *Brucella spp.* und *Bacteroides fragilis*, in der Regel auch *Proteus spp.* und *Serratia marcescens*, teilweise *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia*, *Prevotella spp.* und *Fusobacterium spp.* (23) Weiterhin zu beachten sind die vor allem bei *A. baumannii* beobachteten heteroresistenten Stämme, bei denen der Colistin-resistente Teil aber deutlich andere AntibioGramme aufweisen kann als die sensible Subpopulation, unter anderem sogar Sensibilitäten gegenüber normalerweise bei gram-negativen Bakterien nicht wirksame Wirkstoffe. (23) Heteroresistenzen wurden auch bei *P. aeruginosa*- und *K. pneumoniae*-Stämmen beobachtet. (1,23)

5.4. Pharmakokinetik

Colistin sowie CMS werden enteral nicht resorbiert, für eine systemische Anwendung müssen sie also intravenös verabreicht werden. (23) CMS hydrolysiert nach Verabreichung schnell, allerdings konnte bei Ratten nur ein Umwandlungsanteil zu Colistin von ca. 7% gezeigt werden (23), während die Tadim[®]-Fachinformation (28) einen Anteil von geschätzten 30% nennt. Das Verteilungsvolumen von Colistin nach CMS-Infusion schwankt zwischen 12,4 L bei gesunden und 139,9 L bei lebensbedrohlich erkrankten Patienten (28), zur letztlichen Gewebsverteilung des entstehenden Colistin gibt es aber kaum verlässliche Informationen. (23) Die Halbwertszeit von CMS beträgt ca. 2,2 Stunden (27), die des entstehenden Colistins ist mit 3 bis 7,4 Stunden (28), abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten, signifikant länger. (23) Der genaue Eliminationsmechanismus ist nicht bekannt, aber Colistin wird großteils nicht-renal eliminiert. (23,28) CMS dagegen wird überwiegend renal ausgeschieden, genannt sind ca. 62% innerhalb von 8h bei normaler Nierenfunktion. (28) Die Nierenfunktion spielt daher eine große Rolle, denn je besser sie ist, desto schneller wird CMS wieder eliminiert, bevor Colistin ausreichend im Plasma kumulieren kann. (27) Andererseits kommt es zu vermehrter Kumulation und damit einem höheren Risiko für Nebenwirkungen, wenn die Nierenfunktion eingeschränkt ist. (27,28,31)

Die Dosierungsschemata zu CMS-Präparaten stehen immer wieder zur Diskussion. Untersuchungen zeigten, dass z.B. eine Dosierung von 1-3 Mio. IE CMS alle 8 Stunden bei normaler bis mäßig eingeschränkter Nierenfunktion, wie sie in dieser Form auch ungefähr den Empfehlungen der Tadim[®]-Fachinformation (28) entspricht, nicht ausreicht, um die Plasmakonzentration verlässlich über der Sensibilitätsgrenze von 2 mg/L zu halten. (27) In diesem Zusammenhang werden auch die derzeitigen Sensibilitätsgrenzen als zu hoch infrage gestellt. (27) Ein stationärer Plasmaspiegel wurde mit diesem Schema erst nach 2-3 Tagen erreicht. (27) Aus diesen Gründen wird eine Initialdosis bei normaler Nierenfunktion empfohlen, da eine ausreichende Colistin-Konzentration im Plasma sonst erst nach 1 bis 2 Tagen erreicht würde und bis dahin Resistenzbildungen provoziert werden könnten. (27) Auch sollte bei mittlerer bis guter Nierenfunktion und einer MHK des Erregers $\geq 1\text{mg/L}$ gegenüber Colistin eine Kombinationstherapie durchgeführt werden, da die ausreichenden Plasma-Konzentrationen von Colistin in diesem Szenario nur schwer zu erreichen sind. (27)

5.5. Nebenwirkungen

Bei systemischer Gabe ist Colistin dosisabhängig vor allem neuro- und nephrotoxisch. (12) Dazu kommen mögliche allergische Reaktionen sowie bei Inhalation auch Bronchospasmen. (12) Zur Reduktion der toxischen Wirkung wurde CMS entwickelt, welches auch eine geringere Toxizität im Vergleich zu Colistin besitzt. (23) Auf der einen Seite scheint die Nephrotoxizität der Polymyxine allgemein seltener aufzutreten, als nach Studien in den 60er und 70er Jahren angenommen wurde. (23) Im Vergleich z.B. mit Tobramycin ist der Anstieg der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase, als frühes Zeichen der Nephrotoxizität, bei CMS-Infusion geringer. (23) Auch in der CMS-Langzeittherapie über mehrere Wochen zeigte sich der Kreatinin-Anstieg unter Therapie danach als reversibel, Dosisanpassungen vorausgesetzt. (23) Pogue et al. merken allerdings an, dass diese in der Literatur veröffentlichten niedrigen Raten an Nephrotoxizität vor allem auf in Europa übliche niedrigere Dosierungen zurückzuführen sind, die vermutlich gar nicht in ausreichenden Colistin-Plasmaspiegeln resultieren. (31) Wende man in den USA übliche Dosierungsschemata an, setze schon vor Ausreizen der empfohlenen maximalen Dosierungen eine Schädigung der Nierenfunktion ein. (31) Bei lebensbedrohlich erkrankten Patienten komme es dabei in ca. 50% der Fälle zu einer Nephrotoxizität, je nach Dosis auch mehr. (1,31) So führten bei Pogue et al. ≥ 3 mg/kg KG pro Tag bei 30% der Patienten, bei ≥ 5 mg/kg KG pro Tag bei 69% zu Nierenschäden. (31) Die Dosierungen beziehen sich auf das Idealgewicht, nicht auf das tatsächliche Gewicht des Patienten. (31) Es kam aber nur zu Funktionsminderungen der Kategorien R bis F nach den RIFLE-Kriterien³, also maximal zu einem größeren Abfall der GFR bzw. Anstieg des Kreatinins, aber nie zu einem persistierenden Nierenversagen. (31) In einer anderen Untersuchung wurde unter CMS-Therapie mit einer Dauer von mehr als 3 Tagen die Nierenfunktion bei US-Soldaten beobachtet, welche in den meisten Fällen keine weiteren Risikofaktoren für eine verminderte Nierenfunktion aufwiesen. (32) Es kam bei 45% zu Funktionsminderung nach den RIFLE-Kriterien R bis F. (32) Da die optimalen Dosierungsschemata noch nicht geklärt sind, kann nicht endgültig gesagt werden, wie häufig Nierenschädigungen bei effizienter Colistin- bzw. CMS-Therapie zu erwarten sind. (31) Der Einfluss anderer Faktoren auf das nierenschädigende Potential von Colistin, wie der Gesundheitszustand

3 Risk (Serum-Kreatinin 1,5-fach erhöht bzw. GFR um >25% erniedrigt), Injury (Serum-Kreatinin verdoppelt bzw. GFR um >50% erniedrigt), Failure (Serum-Kreatinin verdreifacht bzw. GFR um >75% erniedrigt), Loss (akutes Nierenversagen, >4 Wochen persistierend), End Stage Renal Disease (terminales Nierenversagen, >3 Monate) (31)

des Patienten und gleichzeitig verabreichte andere Medikamente, erschweren die Beurteilung. (23,31) Die Nierenschäden sind aber bei den momentan üblichen Dosierungen relativ geringfügig und nach Beendigung der Therapie meist reversibel. (32)

Neurotoxizität tritt nur selten auf. (23,32) Die Symptome sind vielfältig und reichen von Schwindel, Kopfschmerzen, Muskelschwäche und Parästhesien bis hin zu teilweiser Taubheit, Halluzinationen, Ataxien und neuromuskulären Blockaden. (23,28) In den letzten 15 Jahren wurden aber keine schwereren neurologischen Folgen durch Polymyxin-Therapie gemeldet, milde Symptome sind normalerweise bei Abbruch der Therapie reversibel. (23) Allergische Reaktionen wurden seit den Studien der 70er Jahre nicht mehr beschrieben, Bronchospasmen sind mit Anwendung von CMS statt Colistinsulfat weniger ausgeprägt und lassen sich durch gleichzeitige Gabe von Bronchodilatoren weiter vermindern. (23)

6) Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der chemischen und pharmakologischen Eigenschaften von CMS wird im Rahmen dieser Arbeit davon ausgegangen, dass sich die antibakterielle Wirkung des klinisch eingesetzten Präparates Tadim[®] erhöht, wenn man die gebrauchsfertige Lösung vor Verabreichung lagert. Dies soll in vitro mittels eines Laborexperiments an gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden. Der Einfluss der Lagerungszeit soll qualitativ per Plättchendiffusionstest und quantitativ per Evaluierung der CFU-Konzentrationen im Laufe der Einwirkzeit des Tadim[®] nachgewiesen und auf seine statistische Signifikanz hin überprüft werden. Anschließend werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert und bzgl. möglicher Schlussfolgerungen für die Therapie mit CMS bzw. Tadim[®] betrachtet, inkl. der sich eventuell ergebenden Problematiken einer Lagerung der CMS-Lösungen vor der Verabreichung.

MATERIAL UND METHODEN

1) Versuchsaufbau

Die geänderte antibakterielle Wirksamkeit des Tadim[®] in Abhängigkeit der Lagerungszeit in wässriger Lösung wurde in einem Laborexperiment sowohl qualitativ per Plättchendiffusionstest als auch quantitativ über die Auswertung der geänderten Anzahl der Colony Forming Units (CFU) während der Versuchsdurchführung überprüft. Die Lösungen und Suspensionen wurden, soweit nicht anders dargestellt, mit 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung (Physiologische Kochsalzlösung 'Fresenius' von Fresenius Kabi) hergestellt. Die verwendeten Agar-Platten waren 'BBL[™] Müller-Hinton-II-Agar'-Platten von Becton Dickinson and Company (folgend als MHA-Platten bezeichnet). Das benutzte Präparat 'Tadim[®] 1 Million I.E. Pulver zur Herstellung einer Lösung für einen Vernebler' wird vertrieben von Profile Pharma Limited und wurde für diese Versuche ausgewählt, weil es im LKH-Universitätsklinikum Graz für die Therapie mit CMS verwendet wird. Es enthält ausschließlich CMS, 1 Million IE entsprechen ca. 80 mg dieses Wirkstoffes. (28)

1.1. Plättchendiffusionstest

Mit diesem Versuch sollte die qualitative Änderung der antibakteriellen Wirkung des Tadim[®] durch Hydrolyse vor der Verabreichung anhand einer zunehmenden Hemmhofbildung nachgewiesen werden. Als Vergleich wurde der Versuch auch mit einem Colistin-Testplättchen der gleichen Wirkstoffkonzentration durchgeführt. Dafür wurde mit den jeweiligen Bakterienpopulationen Keimsuspensionen in einer Dichte von McFarland 0,5 hergestellt, mit der im Laufe des Experiments MHA-Platten bestrichen wurden. Zu Beginn des Experiments wurde dann eine Tadim[®]-Lösung in der Konzentration 1 g/L hergestellt, ein wirkstofffreies Testplättchen (BBL[™] Blank Paper Discs 6 mm von Becton Dickinson and Company) mit 10 µL dieser Lösung beimpft und auf eine der vorbereiteten MHA-Platten aufgelegt. So ergab sich in diesen Testplättchen eine Wirkstoffmenge von 10 µg CMS, deren Wirkung dann mit der eines Colistin-Testplättchen mit einer Wirkstoffmenge von ebenfalls 10 µg verglichen werden konnte (BBL[™] Sensi-Disc[™] Antimicrobial Susceptibility Test Discs Colistin³⁵ CL-10 von Becton Dickinson and Company). Dieses Colistin-Plättchen wurde einmalig zu Beginn des Experiments auf eine separate, vorbereitete MHA-Platte aufgelegt. Die Tadim[®]-Lösung wurde bei

Raumtemperatur aufbewahrt und mit ihr nach 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden Lagerungszeit jeweils ein weiteres Testplättchen beimpft und auf eine jeweils frisch vorbereitete MHA-Platte gegeben. Die mit Testplättchen versehenen MHA-Platten wurden bei 37°C bebrütet und die Hemmhöfe nach 24 Stunden abgelesen. Der Versuch wurde für jede ausgewählte Bakterienpopulation dreifach durchgeführt.

1.2. Quantitative Kulturen

Die geänderte qualitative antibakterielle Wirkung der Tadim[®]-Lösung sollte auch quantitativ nachgewiesen und dargestellt werden. Dazu wurden Overnight-Kulturen der Populationen mit der Boullion einer aeroben Blutkulturflasche (BACTEC[™] Plus Aerobic/F Culture Vials von Becton Dickinson and Company) in einer Keimkonzentration von ca. $5 \cdot 10^8$ CFU/mL hergestellt und 6 Stunden vorher Tadim[®]-Lösungen in den Konzentrationen 8 mg/L und 32 mg/L vorbereitet. Die 6 Stunden wurden ausgewählt, da sich bei den Plättchendiffusionstests in diesem Bereich des Lagerungszeitraums die ersten signifikanten Änderungen in der antibakteriellen Wirksamkeit zeigten. Die Konzentrationen der Tadim[®]-Lösungen wurden so gewählt, dass sie mögliche klinisch anwendbare Lösungen repräsentieren und einen Vergleich zu den quantitativen Versuchen von Bergen et al. bieten, wo dieselben Konzentrationen benutzt wurden. (2) Zu Beginn des Experiments wurden dann zwei weitere Tadim[®]-Lösungen in den Konzentrationen 8 mg/L und 32 mg/L hergestellt. Die Overnight-Kulturen wurden zuerst mittel einer Verdünnungsreihe verdünnt und anschließend mit den Tadim[®]-Lösungen gemischt, sodass sich letztlich eine Keimkonzentration von ca. $5 \cdot 10^2$ CFU/mL ergab. Bei dieser Konzentration war eine spätere manuelle Auszählung der gewachsenen Einzelkulturen möglich. Zusammengefasst resultierten folglich pro Overnight-Kultur insgesamt 4 Tadim[®]-Keim-Gemische, nämlich 2 mit den 6 Stunden gelagerten Tadim[®]-Lösungen und 2 mit den frisch hergestellten Tadim[®]-Lösungen. Zusätzlich wurde auch ein Keim-Gemisch mit 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung statt Tadim[®]-Lösung als Vergleichsprobe erzeugt. Nachdem die Keim-Gemische hergestellt waren, wurde von diesen jeweils 0,1 mL auf MHA-Platten aufgetragen und sowohl die Platten als auch die Keim-Gemische in einen Brutschrank mit 37°C gegeben. Folgend wurden von den Keim-Gemischen nach 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden weitere jeweils 0,1 mL entnommen und auf MHA-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden insgesamt 24 Stunden bebrütet, dann die Kolonien

ausgezählt und daraus die CFU-Konzentration der Tadim[®]- bzw. NaCl-Keim-Suspensionen errechnet.

2) Bakterienpopulationen

Die Bakterienpopulationen wurden aus der Stammsammlung des mikrobiologischen Labors der LKH-Universitätsklinik für Innere Medizin in Graz ausgesucht. Dabei sollten aus der Gruppe der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae Populationen gewählt werden, die zum einen multiresistent und möglichst Carbapenemase-bildend, aber Colistin-sensibel waren, und zum anderen Populationen, die eine Colistin-Resistenz aufwiesen. Von den gewählten Populationen wurde dann ein Antibiotogramm mittels Plättchendiffusionstest angefertigt. Getestet wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Wirkstoffe. Gegebenenfalls wurden die produzierten β -Lactamasen durch Epsilometertests und Hodge-Test näher charakterisiert und bei den Enterobakterien Differenzierungs-Sets zur Identifizierung von Carbapenemasen angewendet. Die MHK gegenüber Colistin wurde ebenfalls mittels Epsilometertest bestimmt. Letztlich wurden je ein Stamm ESBL-produzierende *Klebsiella oxytoca*, Metallo- β -Lactamase-bildende *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und Colistin-resistentes *Chryseobacterium indologens* ausgewählt, allesamt multiresistent, aber in unterschiedlicher Ausprägung, wie in Tabelle 2 genauer dargestellt. Der Plättchendiffusionstest wurde mit allen vier Stämmen durchgeführt, für die quantitativen Kulturen wurden *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* ausgewählt.

3) Datenauswertung

Die ermittelten Daten wurden deskriptiv ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Zunahmen der Hemmhöfe im qualitativen Versuchsteil wurden per one-way-ANOVA auf ihre Signifikanz überprüft. Für die quantitativen Kulturen wurde die repeated-measures-ANOVA zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der CFU-Konzentrationsänderungen im Versuchsverlauf angewendet. Die antibakterielle Wirksamkeit wurde über die Auswertung der Area Under the Curve (AUC) der Zeit-CFU/mL-Kurven veranschaulicht, welche untereinander ebenfalls mittels der one-way-ANOVA auf signifikante Unterschiede überprüft wurden. Zeigten sich signifikante Unterschiede bei den ANOVAs, wurde ein Post-Test nach Bonferroni durchgeführt.

Wirkstoff	Sensibilität			
	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. indologens</i>
Ampicillin	-	-	-	-
Amoxicillin + Clavulansäure	-	-	-	-
Piperacillin + Tazobactam	-	-	+	(+)
Cefuroxim	-	-	-	-
Cefotaxim	+	-	-	-
Ceftazidim	-	-	-	-
Cefepim	-	-	+	-
Imipenem	+	-	-	-
Meropenem	+	-	-	-
Ertapenem	+	-	-	-
Aztreonam	-	-	(+)	-
Ciprofloxacin	-	-	-	-
Levofloxacin	-	-	-	-
Gentamicin	(+)	-	+	+
Amikacin	+	-	-	(+)
Tobramycin	-	-	-	-
Colistin	+ MHK: 0,125 mg/L	+ MHK: 0,25 mg/L	+ MHK: 2 mg/L	- MHK: > 265 mg/L

Tabelle 2: Antibiogramm der ausgewählten Populationen inkl. MHK für Colistin (sensibel = +; intermediär resistent = (+); resistent = -)

ERGEBNISSE

1) Plättchendiffusionstest

Die Messergebnisse der Plättchendiffusionstests sind im Anhang tabellarisch aufgelistet, zusammen mit den Mittelwerten und den Standardabweichungen (Tab. 5, 6, und 7). Beim *Chryseobacterium indologens* haben sich in allen drei Durchgängen weder bei den Tadim[®]-Lösungen noch bei den Colistin-Testplättchen Hemmhöfe gebildet, daher werden die Ergebnisse nicht weiter beschrieben. Die folgenden Scatterplots (Abb. 6, 7 und 8) zeigen graphisch die einzelnen Messwerte sowie die Mittelwerte der Versuche mit den anderen Isolaten. Neben den resultierten Hemmhöfen der Tadim[®]-Lösungen sind zum Vergleich die Werte der Colistin-Testplättchen dargestellt, im Abbildungstext sind die statistisch signifikanten Unterschiede vermerkt. Die Streuung ist gering, größere Ausreißer gibt es nicht. Mit längerer Lagerungszeit der Tadim[®]-Lösung waren durchwegs gleich große oder größere Hemmhöfe zu erzielen. Die größten Zuwachsraten (Tab. 8, im Anhang) wurden mit einer Lagerungszeit von 4 bis 6 Stunden erreicht, nach dieser Zeit waren auch die ersten statistisch signifikanten Unterschiede der Hemmhofgrößen nachweisbar. Ab etwa 8 Stunden nahmen die Zuwachsraten wieder ab.

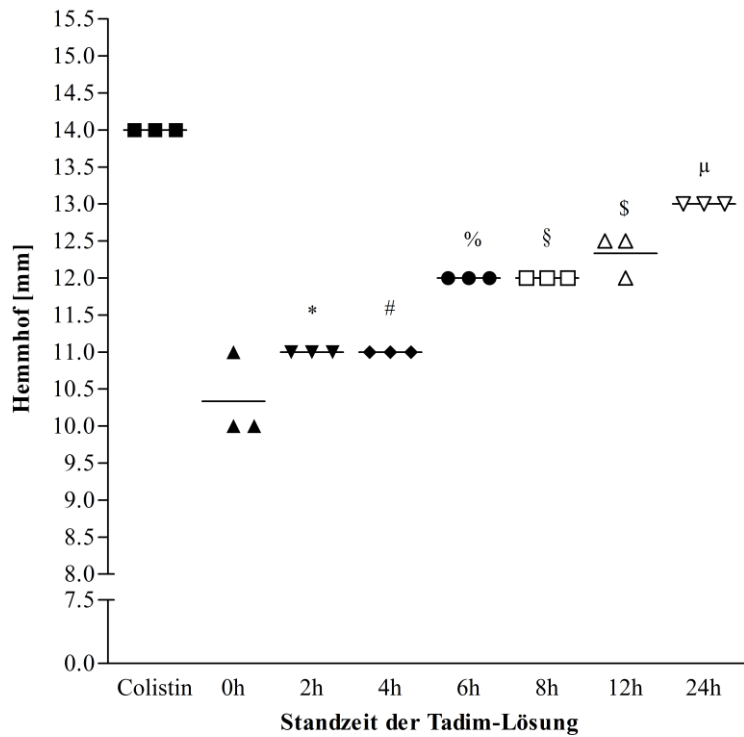


Abbildung 6: *Klebsiella oxytoca*; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich. Die Linien zeigen die Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte: *: $p < 0,01$ 2h vs. 6h bis 24h; #: $p < 0,01$ 4h vs. 6h bis 24h; %: $p < 0,01$ 6h vs. 0h, 2h, 4h und 24h; §: $p < 0,01$ 8h vs. 0h, 2h, 4h und 24h; \$: $p < 0,001$ 12h vs. 0h, 2h und 4h; μ : $p < 0,01$ 24h vs. 0h bis 8h

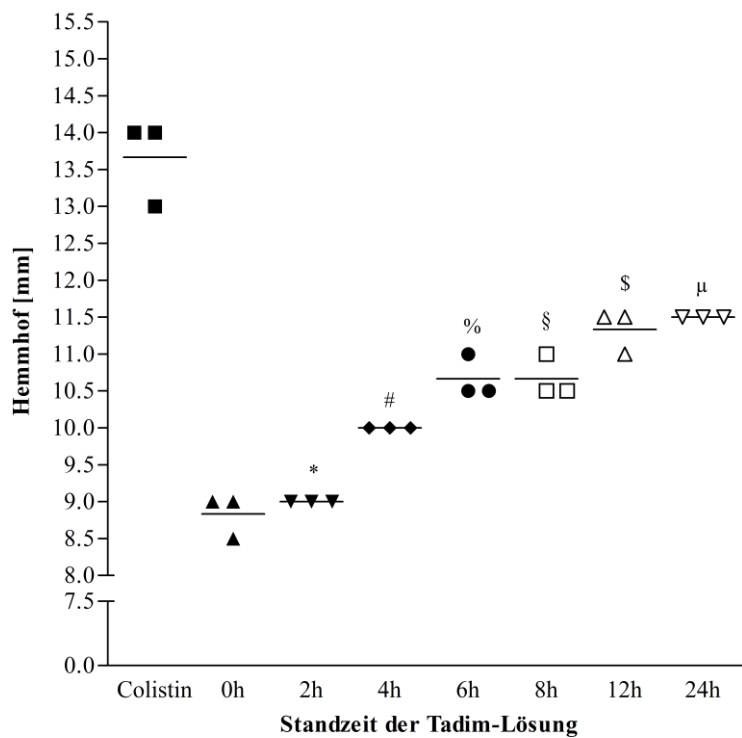


Abbildung 7: *Klebsiella pneumoniae*; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich. Die Linien zeigen die Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte: *: $p < 0,01$ 2h vs. 4h bis 24h; #: $p < 0,05$ 4h vs. 0h, 2h und 6h bis 24h; %: $p < 0,05$ 6h vs. 0h bis 4h, 12h und 24h; §: $p < 0,05$ 8h vs. 0h bis 4h, 12h und 24h; \$: $p < 0,05$ 12h vs. 0h bis 8h; μ : $p < 0,01$ 24h vs. 0h bis 8h

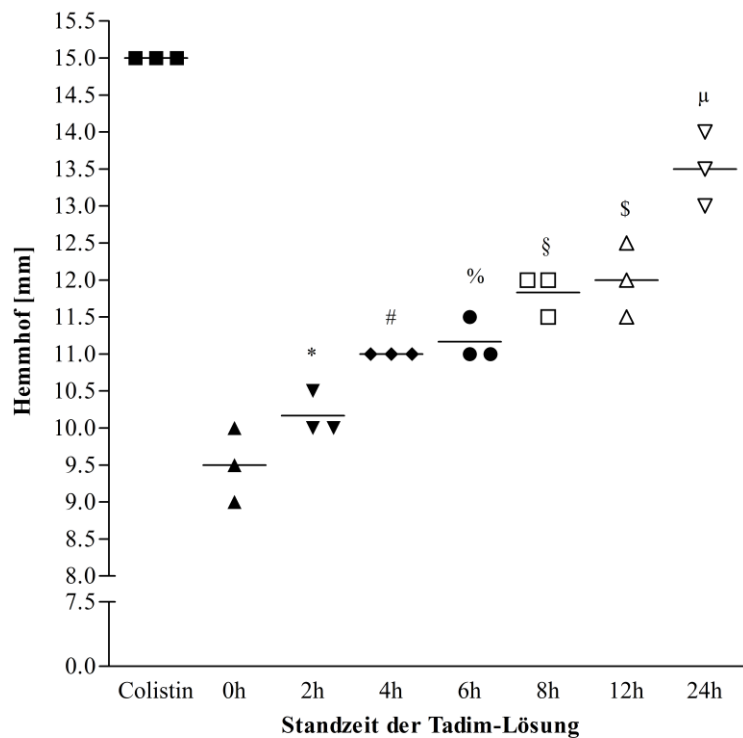


Abbildung 8: *Pseudomonas aeruginosa*; einzelne Messwerte der Hemmhofgrößen im Vergleich. Die Linien zeigen die Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte:

*: $p < 0,01$ 2h vs. 8h bis 24h; #: $p < 0,05$ 4h vs. 0h und 24h; %: $p < 0,01$ 6h vs. 0h und 24h; §: $p < 0,01$ 8h vs. 0h, 2h und 24h; S: $p < 0,05$ 12h vs. 0h, 2h und 24h; μ: $p < 0,05$ 24h vs. 0h bis 12h

2) Quantitative Kulturen

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Die Messergebnisse dieses Versuchs mit *K. pneumoniae* sind im Anhang aufgelistet (Tab. 9, 10 und 11). Die Abbildungen 9 und 10 zeigen den zeitlichen Verlauf der CFU-Konzentrationen nach Zugabe der Tadim[®]-Lösungen im Vergleich mit der NaCl-Keim-Suspension als Kontrolldurchlauf. Dargestellt sind neben den Mittelwerten die Standardabweichungen als Fehlerbalken. Als zusätzliche Markierung ist für eine CFU-Konzentration von 10 CFU/mL ein "Cut-Off" eingetragen. Unterhalb dieser Linie müssen gemessene Werte mit einem gewissen Vorbehalt betrachtet werden, da die Versuchsmethode für diesen Konzentrationsbereich zu ungenau ist und die Messwerte möglicherweise falsch niedrig sind.

Der **Kontrolldurchlauf** zeigte eine relativ stabil bleibende Konzentration an CFU. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Zeitpunkte, und

die Streuung der Werte bewegte sich innerhalb einem nach der Versuchs- und Messmethode erwartbaren Bereich. Die Kurven der Suspensionen der **8 mg/L-Tadim[®]-Lösungen** (Abb. 9) verlaufen gleichmäßig mit der Kurve der NaCl-Keim-Suspension. Bei der gelagerten gibt es zwar signifikante Unterschiede der CFU-Konzentrationen, aber nur zum Zeitpunkt 4 Stunden waren im Vergleich zu den beiden anderen Suspensionen deutlich geringere Werte feststellbar. Die 6h-Probe lieferte wieder einen Mittelwert auf Vorniveau. Nur bei dem Versuch mit **Tadim[®]-Konzentrationen von 32 mg/L** (Abb. 10) setzten sich die CFU-Konzentrationen merklich von den Suspensionen mit NaCl ab. Wurde die frisch angesetzte Tadim[®]-Lösung genutzt, zeigte sich ein CFU-Abfall nach 8 Stunden, und nach 24 Stunden blieben CFU in allen Proben nachweisbar. Die gelagerte Lösung führte schon mit der 2h-Probe zu gesunkener CFU-Konzentration, und nach 24 Stunden war in einer Probe keine CFU mehr nachweisbar.

Tabelle 3 stellt vergleichend die „**areas under the curves**“ (AUC) dar, um die quantitativen Unterschiede in der antibakteriellen Aktivität während des gesamten Versuchsablaufes aufzuzeigen. Man sieht, dass die Flächen unter den Kurven der Suspensionen mit 8 mg/L-Tadim[®]-Konzentration sich zu den Flächen unter den Kurven der NaCl-Keim-Suspension nicht merklich unterscheiden. Erst die höhere Tadim[®]-Konzentration zeigte bei beiden Kurven jeweils eine statistisch eindeutig nachweisbare antibakterielle Wirkung. Untersucht man über die AUC ebenfalls den Unterschied zwischen den frischen und den gelagerten Tadim[®]-Lösungen, konnte kein größerer Unterschied aufgezeigt werden.

AUC ₀₋₂₄				
	Tadim [®] frisch [8 mg/L]	Tadim [®] 6h gelagert [8 mg/L]	Tadim [®] frisch [32 mg/L]	Tadim [®] 6h gelagert [32 mg/L]
NaCl	65,5 ± 4,3	61,7 ± 2,3	64,7 ± 1,2	44,3 ± 2,0 [#]
				39,0 ± 4,2 [*]

Tabelle 3: *Klebsiella pneumoniae*; mittlere AUC₀₋₂₄ mit Standardabweichung der Kurven von log₁₀ CFU/mL über der Zeit (Keimsuspension + NaCl bzw. entsprechende Tadim[®]-Lösung) Statistisch signifikante Unterschiede:

#: p < 0,001 bei der Suspension mit frischer 32 mg/L Tadim[®]-Lösung verglichen mit den Suspensionen mit NaCl, mit frischer und mit gelagerter 8 mg/L Tadim[®]-Lösung

*: p < 0,001 bei der Suspension mit gelagerter 32 mg/L Tadim[®]-Lösung verglichen mit den Suspensionen mit NaCl, mit frischer und mit gelagerter 8 mg/L Tadim[®]-Lösung

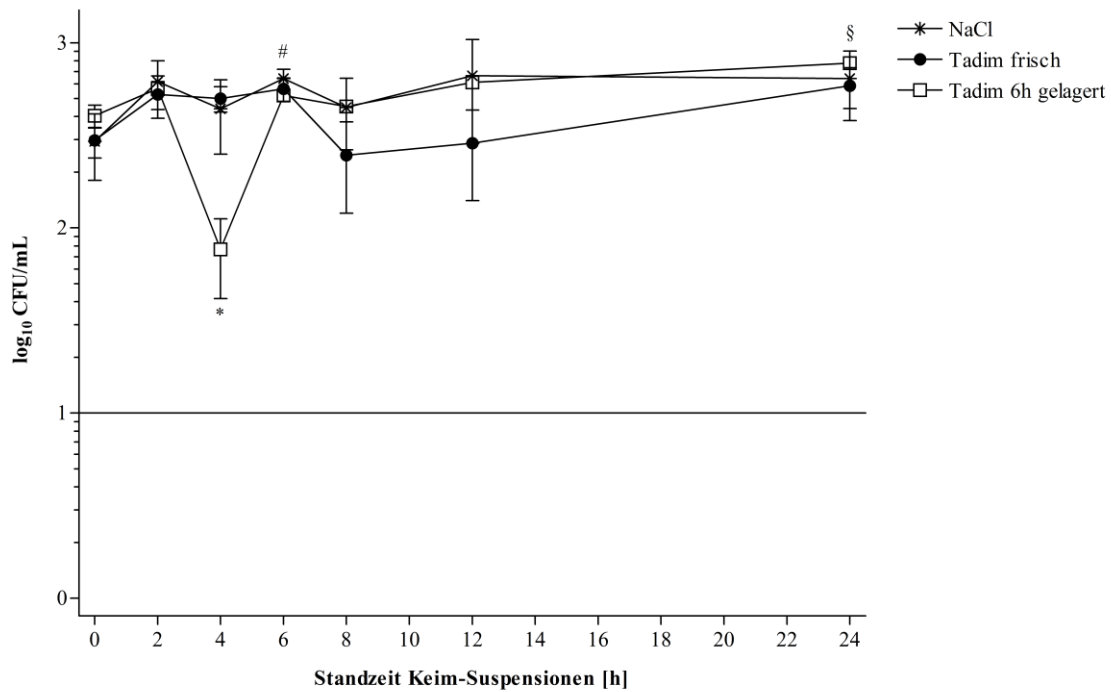


Abbildung 9: *Klebsiella pneumoniae*; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe von NaCl bzw. der frischen und der gelagerten Tadim-Lösung [8 mg/L]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die horizontale Linie bei $y = 1$ markiert den Cut-Off. Statistisch signifikante Unterschiede der markierten Mittelwerte:

- Graph „Tadim 6h gelagert“:
 - *: $p < 0,01$ 4h vs. 0h, 2h und 6h bis 24h; #: $p < 0,05$ 6h vs. 4h und 24h; §: $p < 0,05$ 24h vs. 0h und 4h bis 8h

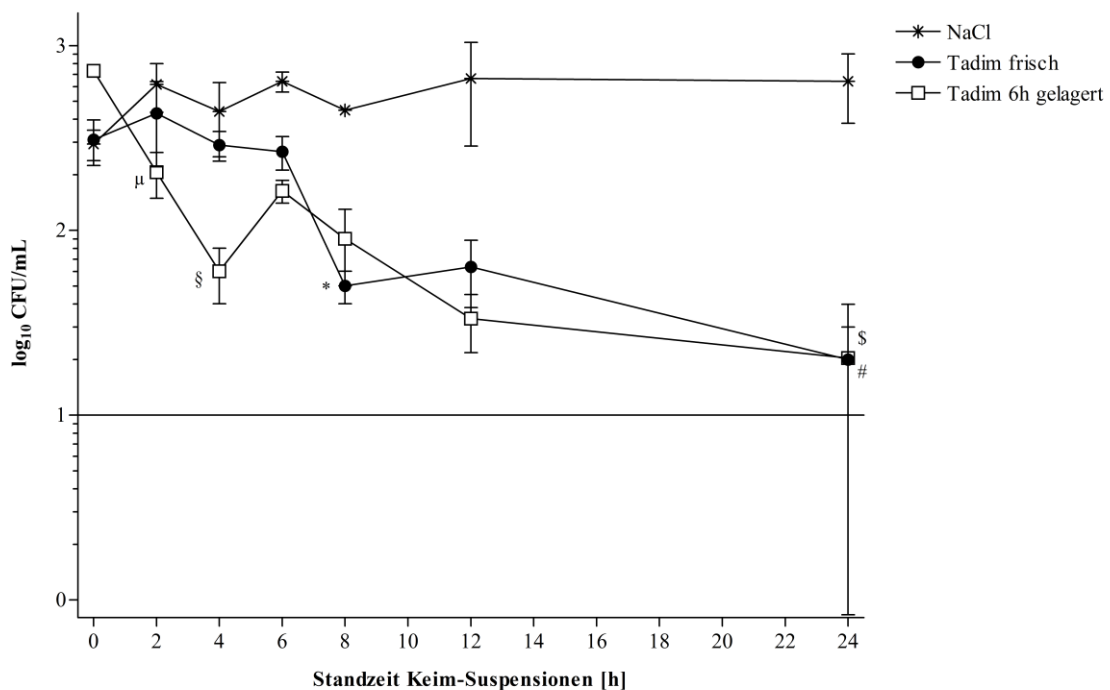


Abbildung 10: *Klebsiella pneumoniae*; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe von NaCl bzw. der frischen und der gelagerten Tadim-Lösung [32 mg/L]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die horizontale Linie bei $y = 1$ markiert den Cut-Off. Statistisch signifikante Unterschiede der markierten Mittelwerte:

- Graph „Tadim frisch“:
 - *: $p < 0,01$ 8h vs. 2h; #: $p < 0,05$ 24h vs. 0h und 2h
- Graph „Tadim 6h gelagert“:
 - μ: $p < 0,05$ 2h vs. 0h, 4h und 8h bis 24h; §: $p < 0,01$ 4h vs. 0h und 2h; S: $p < 0,01$ 24h vs. 0h, 2h und 6h

2.2. Pseudomonas aeruginosa

Im Anhang sind die Messergebnisse der CFU-Konzentration bei *P. aeruginosa* aufgeführt (Tab. 12, 13, 14) und in den Abbildungen 11 und 12 graphisch dargestellt. Diese Versuche zeigten sich etwas inkonsistenter als bei *K. pneumoniae*. Es ergaben sich zum Teil deutliche Schwankungen, die auch beim **Kontrollversuch** zu einem statistisch signifikanten Unterschied führten. Die Suspensionen mit **8 mg/L-Tadim[®]-Lösung** (Abb. 11) wiesen zwar mehrere signifikante Unterschiede der Mittelwerte auf, die Ergebnisse bewegten sich aber überwiegend parallel zum Kontrollversuch und sanken insgesamt betrachtet nicht nennenswert ab. Die Graphen der Suspensionen mit **32 mg/L-Tadim[®]-Lösung** (Abb. 12) setzten sich erst mit der 24h-Messung vom Kontrolldurchgang sichtbar ab. Nur mit der gelagerten Tadim[®]-Lösung führte eine Messung zu keiner nachweisbaren CFU. Vergleicht man die **AUC** der Graphen (Tab. 4) miteinander, zeigen sich auch hier sehr ähnliche Werte. Eine statistisch signifikante Veränderung im Vergleich zum Kontrollversuch mit NaCl zeigt sich anhand der AUC nur bei den Versuchen mit der 6 Stunden gelagerten Tadim[®]-Lösung der Konzentration 32 mg/L. Untersucht man den

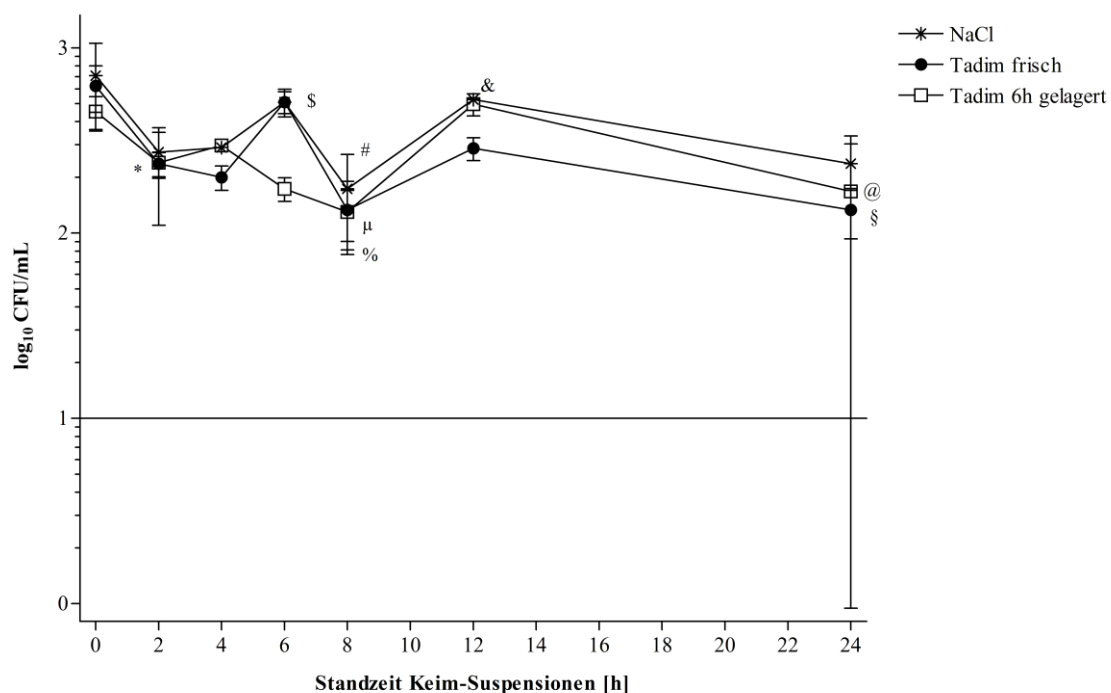


Abbildung 11: *Pseudomonas aeruginosa*; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe von NaCl bzw. der frischen und der gelagerten Tadim[®]-Lösung [8 mg/L]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die horizontale Linie bei $y = 1$ markiert den Cut-Off. Statistisch signifikante Unterschiede der markierten Mittelwerte:

- Graph „NaCl“:
#: $p < 0,05$ 8h vs. 0h
- Graph „Tadim frisch“:
*: $p < 0,05$ 2h vs. 0h und 6h; §: $p < 0,05$ 6h vs. 2h, 4h, 8h und 24h; μ : $p < 0,001$ 8h vs. 0h und 6h; §: $p < 0,001$ 24h vs. 0h und 6h
- Graph „Tadim 6h gelagert“:
%: $p < 0,05$ 8h vs. 0h und 12h; &: $p < 0,05$ 12h vs. 6h, 8h und 24h; @: $p < 0,05$ 24h vs. 12h

Unterschied der AUC zwischen den einzelnen Tadim[®]-Keim-Gemischen, kann ebenfalls nur die gelagerte 32 mg/L-Tadim[®]-Lösung eine statistisch signifikante Verringerung im Vergleich zur geringeren Tadim[®]-Konzentration vorweisen. Der direkte Vergleich mit der frisch hergestellten Tadim[®]-Lösung der Konzentration 32 mg/L ergab aber keinen wesentlichen Unterschied.

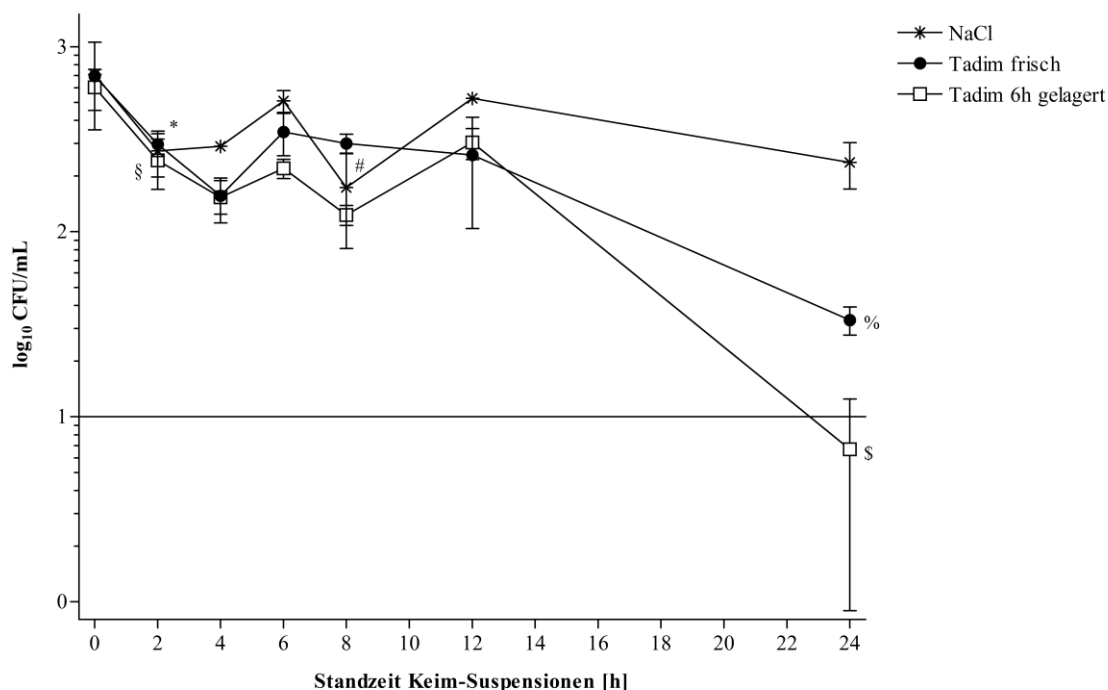


Abbildung 12: *Pseudomonas aeruginosa*; CFU/mL im Zeitverlauf nach Zugabe von NaCl bzw. der frischen und der gelagerten Tadim[®]-Lösung [32 mg/L]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die horizontale Linie bei $y = 1$ markiert den Cut-Off. Statistisch signifikante Unterschiede der markierten Mittelwerte:

- Graph „NaCl“:
 - #: $p < 0,05$ 8h vs. 0h
- Graph „Tadim frisch“:
 - *: $p < 0,05$ 2h vs. 0h und 24h; %: $p < 0,05$ 24h vs. 0h, 2h, 6h, und 8h
- Graph „Tadim 6h gelagert“:
 - §: $p < 0,05$ 2h vs. 0h und 24h; \$: $p < 0,05$ 24h vs. 0h, 2h und 12h

AUC ₀₋₂₄				
NaCl	Tadim [®] frisch [8 mg/L]	Tadim [®] 6h gelagert [8 mg/L]	Tadim [®] frisch [32 mg/L]	Tadim [®] 6h gelagert [32 mg/L]
60,53 ± 1,19	56,12 ± 1,96	56,52 ± 3,39	52,7 ± 2,02	46,63 ± 3,93 [#]

Tabelle 4: *Pseudomonas aeruginosa*; mittlere AUC₀₋₂₄ mit Standardabweichung der Kurven von log₁₀ CFU/mL über der Zeit (Keimsuspension + NaCl bzw. entsprechende Tadim[®]-Lösung) Statistisch signifikante Unterschiede: #: $p < 0,001$ bei der Suspension mit gelagerter 32 mg/L Tadim[®]-Lösung verglichen mit der Suspension mit NaCl; $p < 0,05$ bei der Suspension mit gelagerter 32 mg/L Tadim[®]-Lösung verglichen mit den Suspensionen mit frischer und mit gelagerter 8 mg/L Tadim[®]-Lösung

DISKUSSION

1) Interpretation der Messergebnisse und Beurteilung der Methodik

Mit den Laborexperimenten dieser Arbeit sollte anhand der Entwicklung der Hemmhöfe bzw. der CFU-Konzentrationen die Fragestellung geklärt werden, ob die Lagerung der Tadim[®]-Lösungen vor Anwendung zu einer signifikanten Steigerung der antibakteriellen Wirksamkeit führt. Mit den Plättchendiffusionstests konnte dieser Einfluss qualitativ bestätigt werden. Bei *C. indologens* bildeten sich zwar wegen einer offensichtlich zu ausgeprägten Resistenz keinerlei Hemmhöfe, weder auf Tadim[®] noch auf Colistin. Bei den als empfindlich getesteten Erregern *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* ließen sich aber in Abhängigkeit von der Lagerungszeit zunehmende Hemmhöfe beobachten. Dabei sieht man, dass der Zusammenhang zwischen Lagerungszeit und Hemmhofgröße nicht linear ist. Die größten Zuwächse pro Stunde Lagerungszeit der Lösungen wurden zwischen 2 bis 6 Stunden beobachtet, in der Zeit danach nehmen die Zuwachsraten ab, zum Teil sehr deutlich. So ist der erste signifikante Unterschied in der Hemmhofgröße nach spätestens 6 Stunden zu sehen (verglichen mit der frischen Lösung), während ab diesem Zeitpunkt die Tadim[®]-Lösungen den nächsten deutlichen Unterschied erst wieder mit 12- bzw. 24-stündiger Lagerung produzierten. Die Größe der Hemmhöfe der Colistin-Tesplättchen war bei den einzelnen Durchgängen eines Versuches überwiegend gleich. Die Hemmhöfe durch die Tadim[®]-Lösungen waren ebenfalls fast konstant. Dies zeigt die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Versuchsdurchführung.

Die absoluten Werte der Plättchendiffusionstests, die sich auf die Tadim[®]-Lösung beziehen, müssen allerdings mit einem gewissen Vorbehalt beurteilt werden. Die Plättchendiffusionstests mit Colistin haben sich z.B. bei der Resistenztestung wegen falschen Ergebnissen und ihrer fehlenden Konkordanz zur MHK als nicht verlässlich herausgestellt. (33,34) Auch repräsentieren die in dieser Arbeit erhobenen Hemmhöfe nicht direkt die Colistin-Konzentration in der Tadim[®]-Lösung zu den getesteten Zeitpunkten, da die Hydrolyse ja auch noch während der Zeit im Brutschrank weiter vonstatten geht. Aber für die Fragestellung dieser Arbeit ist nicht die absolute Hemmhofgröße von Bedeutung, sondern vielmehr die Entwicklung der Größen und damit ihr relatives Verhältnis zueinander. Und da auch die weiter voranschreitende Hydrolyse innerhalb der Testplättchen bzw. während der Diffusion im Agar alle Proben gleichermaßen betrifft,

können die erhobenen Ergebnisse trotzdem zur Beurteilung der qualitativen Änderung der antibakteriellen Wirkung herangezogen werden.

Die Verhältnisse zwischen den Hemmhöfen durch die Tadim[®]-Lösungen und denen durch die Colistin-Testplättchen sollen dabei aber nicht missinterpretiert werden. Sie sind nicht direkt miteinander vergleichbar, sondern haben lediglich orientierende Aussagekraft. Zum einen wurde auf die Testplättchen zwar dieselbe Masse an CMS gegeben wie Colistin in den Colistin-Plättchen vorhanden ist, aber nicht dieselbe Stoffmenge. Die Tadim[®]-Stoffmenge betrug ca. das 0,67- bis 0,8-fache des Colistins in den vorgefertigten Testplättchen, je nach dem, ob man Colistin oder Colistinsulfat als deren Wirkstoff annimmt, was nicht genau eruierbar war. Die gemessenen Hemmhöfe durch Tadim[®] erreichten dadurch, wie erwartet, nicht die Größe derer durch Colistin, die das Maximum angeben, was bei gleicher Colistinmenge in den Tadim[®]-Testplättchen erreichbar sein sollte. Aber die Hemmhöfe durch Tadim[®] sind größer, als das Verhältnis der Stoffmengen selbst bei kompletter Hydrolyse des CMS im Tadim[®] zu Colistin erwarten lassen würde (nach 24 Stunden wurden z.B. 11,5 – 14 mm statt 8,7 – 12 mm beobachtet). Eventuell liegt die Ursache darin, dass die hergestellten Tadim[®]-Testplättchen durch den Versuchsaufbau notwendigerweise feucht waren, und so das Tadim[®] leichter in den Agar diffundieren konnte als das Colistin der trockenen Colistin-Testplättchen.

Die quantitativen Versuche mit *K. pneumoniae* lieferten in den Referenzdurchgängen mit NaCl dem Versuchsaufbau und -ablauf angemessene Ergebnisse ohne deutliche Schwankungen der Mittelwerte, die die anderen Versuchsergebnisse als nicht zuverlässig erscheinen lassen könnten. Lediglich die 4h-Werte der 6 Stunden gelagerten Tadim[®]-Lösung mit 8 mg/L wirken falsch niedrig. Während ein solcher Abfall der CFU in diesem Zeitintervall von dieser Lösung zwar erhofft und erwartet wurde, stehen die nachfolgenden CFU-Werte auf vorherigem Niveau dazu in deutlichem Kontrast. Es ist unwahrscheinlich, dass die Bakterienanzahl unter den Umständen sich wieder so schnell vollständig erholt. Die Auswertung der AUC ergab zwar einen dosisabhängigen Zusammenhang, bei dem die Lösungen mit einer Tadim[®]-Konzentration von 32 mg/L eine statistisch signifikante Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit im Vergleich zu den Lösungen mit 8 mg/L haben. Aber eine Verbesserung durch eine 6-stündige Lagerung konnte über die AUC nicht nachgewiesen werden. Lediglich wenn man die einzelnen Verläufe der CFU-Konzentrationen betrachtet, kann man Unterschiede ausmachen. Während die frisch angesetzte 32 mg/L-Tadim[®]-Lösung erst nach 8 Stunden zu sinkenden CFU-Konzentrationen führt, ergeben sich bei der 6 Stunden gelagerten Lösung gleicher

Konzentration bereits nach 2 Stunden signifikant geringere Messwerte. Auch ist es erst mit dieser Lösung in einer Probe möglich gewesen, keine CFU mehr nachzuweisen.

Die Versuchsreihe mit *P. aeruginosa* lieferte nicht so schwankungsarme Ergebnisse wie die mit *K. pneumoniae*. Die Referenzversuche mit NaCl zeigten eine größere Streuung, die zu teilweise deutlichen Schwankungen der Mittelwerte führte. Der frischen 8 mg/L Tadim[®]-Lösung können zwar statistisch signifikante Abfälle der CFU-Konzentration nach 2 und 8 Stunden nachgewiesen werden. Dies scheint sich aber eher durch Messschwankungen zu ergeben, denn die 6h-Konzentration war dem Ausgangswert wieder ähnlich und die nachfolgenden blieben weiter auf dem Niveau von 2 und 4 Stunden. Auch die bis 8 Stunden sinkenden Werte bei der gelagerten 8 mg/L Lösung sind vermutlich nur Ausdruck der Streuung, da die 12h-Messung wieder Werte auf Ausgangsniveau ergab. Auch der 24h-Mittelwert war statistisch nicht signifikant geringer zum 0h-Wert, wies aber einen deutlich geringeren Einzelmesswert auf. Inwieweit dieser verlässlich oder nur streuungsbedingt ist, bleibt unklar. Vermutlich wird letzteres der Fall sein, da ansonsten ein besserer antibakterieller Effekt nachweisbar wäre als bei den Versuchen mit *K. pneumoniae*, welche aber eine geringere MHK aufwies. Deutlichere Ergebnisse zeigte dafür die letzte Messung der Versuche mit der frischen 32 mg/L Tadim[®]-Lösung. Sie ergab signifikant deutlich geringere Messwerte. Ebenso auch die gelagerte Lösung mit dieser Tadim[®]-Konzentration, bei welcher sich auch in einer Einzelmessung keine CFU mehr nachweisen ließen. So zeigte sich auch bei *P. aeruginosa* vor allem ein von der Tadim[®]-Konzentration abhängiger antibakterieller Effekt. Dabei führte aber nur die Lagerung zu einem Messergebnis ohne Nachweisbarkeit einer CFU. Betrachtet man nun die AUCs im Vergleich, wird der Vorteil schon deutlicher. Die gelagerte 32 mg/L-Lösung konnte zwar verglichen mit der frischen Lösung dieser Konzentration keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Aber nur sie hatte signifikant bessere AUCs vorzuweisen als die Referenzversuche mit NaCl und die Lösungen der Konzentration mit 8 mg/L.

Was deutlich auffiel, waren die unterschiedlichen Entwicklungen der CFU-Konzentrationen im Vergleich zur Studie von Bergen et al. (2) Die dort benutzte Population von *P. aeruginosa* wies eine MHK von 1 mg/L gegenüber Colistin auf. Dies war zwar geringer als bei *P. aeruginosa* in dieser Arbeit, aber 4-mal größer als bei der benutzten Population *K. pneumoniae*. Trotzdem konnte in beiden Versuchen keine vergleichbare Reduktion der CFU-Konzentration erreicht werden. Bei Bergen et al. war bei einer CMS-Konzentration von 32 mg/L ein deutlicher Abfall der CFU/mL bereits nach 1 Stunde

sichtbar, nach 3 Stunden waren bereits keine CFU mehr nachweisbar. (2) Auch bei 8 mg/L CMS-Konzentration sanken die gemessenen CFU/mL ab ca. 1,5 Stunden bis ca. 3,5 Stunden. (2) In unserer Arbeit dagegen zeigten sich keine sichtbaren Änderungen, wenn die Tadim[®]-Lösungen mit den Konzentrationen von 8 mg/L benutzt wurden. Erst mit Konzentrationen von 32 mg/L ließ sich ein CFU-Abfall bei *K. pneumoniae* ab 8 Stunden mit der frischen und bereits mit 2 Stunden mit der gelagerten Tadim[®]-Lösung nachweisen. Bei *P. aeruginosa* wurden deutliche Minderungen der CFU erst mit 32 mg/L Tadim[®] in der Zeit zwischen 12 und 24 Stunden erreicht. Bei beiden Spezies konnte zu keinem Zeitpunkt in allen drei Durchgängen völlige fehlende Nachweisbarkeit an CFU festgestellt werden. Da sowohl Tadim[®]-Konzentrationen als auch Inkubationstemperatur gleich gewählt waren, somit also die Hydrolyse des Tadim[®] zu Colistin in gleichem Maße ablaufen sollte, hätten durch die geringeren CFU-Konzentrationen der Ausgangslösungen (ca. 5×10^2 statt wie bei Bergen et al. (2) ca. 5×10^5 CFU/mL) die CFU-Werte bei unseren Experimenten deutlicher und schneller abfallen müssen. (27) Was genau diese unterschiedlichen Beobachtungen verursacht, bleibt offen.

Die quantitativen Versuche ergaben zusammengefasst also nicht so eindeutige Ergebnisse bzgl. der Fragestellung wie die qualitativen. Hier wäre die Überprüfung des Effekts auf die CFU-Entwicklung bei längeren Lagerungszeiten der Tadim[®]-Lösung sicherlich interessant. Insgesamt ließ sich aber qualitativ und quantitativ die Arbeitshypothese bestätigen, der antibakterielle Effekt des in wässrigem Milieu gelösten Tadims[®] würde mit andauernder Lagerungszeit dieser Lösungen zunehmen. Fasst man die Resultate beider Versuchsteile unter der Annahme zusammen, diese in vitro Ergebnisse wären direkt auf die Situation in vivo übertragbar, wäre eine Lagerung von mindestens 6 Stunden nötig, um verlässlich eine bessere Wirksamkeit des Tadim[®] gleich zu Beginn der Behandlung durch präformiertes Colistin zu erlangen. Dies wäre vor dem Hintergrund der andauernden Diskussionen und Untersuchungen, dass die derzeitigen Dosierungsschemata nicht zu ausreichenden Colistin-Plasmakonzentrationen gerade zu Beginn der Therapie führten (27), durchaus sinnvoll.

2) Konsequenzen höherer Colistin-Konzentrationen in CMS-Lösungen

Da die Hydrolyse von CMS eine geänderte Zusammensetzung der Arzneimittellösung ergibt, nämlich einen erhöhten Anteil an Colistin und weniger CMS, müssen die dann geänderten pharmakologischen Eigenschaften berücksichtigt werden. Da Colistin eine höhere Halbwertszeit hat, müssen die verabreichten Dosen angepasst werden, da die folgenden höheren Plasmaspiegel zum Auftreten von Nebenwirkungen führen könnten. Gerade für die intravenöse Anwendung von Colistinsulfat bzw. CMS-Lösungen, die bereits einen nennenswerten Anteil an Colistin entwickelt haben, gibt es bisher keine dokumentierten und ausgewerteten Erfahrungen. (25) Bezüglich gelagerter Lösungen zur Inhalation wurde 2007 ein Fall mit letalem Ausgang assoziiert. (35) Eine 29-jährige Patientin mit chronischer Atemwegsinfektion durch *P. aeruginosa* bei Mukoviszidose erhielt 75 mg CMS zweimal täglich inhalativ als Erhaltungstherapie. (35) Ein paar Stunden nach Beginn der Therapie verschlechterte sich die Symptomatik. (35) In den folgenden 3 Tagen entwickelte sich eine respiratorische Insuffizienz und es wurde klinisch ein Acute Respiratory Distress Syndrome diagnostiziert. (35) An pathogenen Erregern konnten nur die bei Mukoviszidose üblichen nachgewiesen werden. (35) Die Patientin verstarb letztlich nach 18 Tagen an Multiorganversagen. (35) Da die genutzte CMS-Lösung vor Anwendung 5 Wochen gelagert und eine andere Ursache nicht ersichtlich war, wurde vermutet, dass der Verlauf als Nebenwirkung einer eventuellen hohen Colistin-Konzentration der CMS-Lösung zu sehen sei. (35) Diese Assoziation kann weder ausgeschlossen noch bestätigt werden, da die Hydrolyse von CMS zu Colistin temperatur- und konzentrationsabhängig ist, aber weder die Lagerungsbedingungen noch die Konzentration der in diesem Fall verwendeten Lösung bekannt sind. (25) Wie in der Einleitung schon ausgeführt, untersuchten Wallace et al. die stattgefundenene Hydrolyse und die Colistin-Konzentration bei CMS-Lösungen zur Inhalation. (25) Diese hatten eine für Inhalationslösungen übliche Konzentration von 77,5 g CMS pro Liter und wurden für 52 Wochen sowohl bei 4°C als auch 25°C gelagert. (25) Selbst nach dieser Zeit hatten sich weniger als 0,1% des CMS in Colistin umgewandelt, und die Hydrolyse zu nur teilweise sulfomethylierten Derivaten konnte durch die fehlende erhöhte Osmolalität ausgeschlossen werden. (25)

3) Zusammenfassung

Alles in allem bleiben noch viele nicht vollständig geklärte Fragen zur Anwendung von Colistin bzw. CMS. Vor dem Hintergrund der wachsenden Notwendigkeit therapeutischer Alternativen gegenüber Infektionen multiresistenter gram-negativer Bakterien werden die Polymyxine in Zukunft wahrscheinlich eine zunehmend größer werdende Rolle spielen, vor allem bei den derzeitigen geringen Aussichten auf neue Wirkstoffe. In den letzten Jahren gab es viele neue Erkenntnisse über die chemischen, pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Colistin und CMS, doch ebenso viele Fragen insbesondere zu der optimalen Dosierung und den Nebenwirkungen sind noch nicht endgültig geklärt. Einerseits scheinen momentane intravenöse Therapieschemata zu zurückhaltend in der Dosierung zu sein, um gerade bei den Patienten mit einer suffizienten Nierenfunktion zügig ausreichende Plasmaspiegel an Colistin zu erhalten. Initiale Aufsättigungsdosen und präformiertes Colistin in CMS-Lösungen könnten hier Vorteile in der Behandlung bringen. Andererseits werden dadurch vor allem nephrotoxische Nebenwirkung provoziert, die in ihrem Ausmaß und Auftreten noch nicht abschließend eingeschätzt werden können. Qualitativ und zum Teil auch quantitativ konnte in dieser Arbeit eine gesteigerte antibakterielle Aktivität des Tadim[®] in vitro nachgewiesen werden, wenn dessen Lösungen vor der Verabreichung mehrere Stunden gelagert wurden. Für eine praktische Umsetzung der Ergebnisse sind aber weitere Untersuchungen nötig, insbesondere zur Sicherheit von CMS-Lösungen mit bereits bestehenden klinisch relevanten Colistin-Konzentrationen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* 2013 Jun;8(6):711-724.
- (2) Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jun;50(6):1953-1958.
- (3) Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK, Jr, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013 Jun;56(12):1685-1694.
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>. Accessed 09/10, 2013.
- (5) Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012 May;18(5):413-431.
- (6) Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* 2013 Jul 11;18(28):20525.
- (7) Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011 May;37(5):415-419.

- (8) Slonczewski J, Foster J. Antimikrobielle Chemotherapie. In: Slonczewski J, Foster J, editors. Mikrobiologie. 2nd ed. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum; 2012. p. 1197-1240.
- (9) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Menzel S, Ruth P. Therapie von Infektionskrankheiten. In: Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Menzel S, Ruth P, editors. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 10th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2013. p. 729-866.
- (10) Madigan M, Martinko J, Brock T. Die Kontrolle des mikrobiellen Wachstums. In: Madigan M, Martinko J, Brock T, editors. Brock Mikrobiologie. 11th ed. München [u.a.]: Pearson Studium; 2009. p. 759-796.
- (11) Brodt H. Wirkung und Resistenz. In: Brodt H, editor. Antibiotika-Therapie. 12th ed. Stuttgart: Schattauer; 2013. p. 4-12.
- (12) Brodt H. Eigenschaften der Antiinfektiva. In: Brodt H, editor. Antibiotika-Therapie. 12th ed. Stuttgart: Schattauer; 2013. p. 31-267.
- (13) Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. Evaluation of Antimicrobial Activity. In: Forbes B, Sahn D, Weissfeld A, editors. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Mo.; London: Elsevier Mosby; 2007. p. 172-214.
- (14) Fast W, Sutton LD. Metallo-beta-lactamase: inhibitors and reporter substrates. *Biochim Biophys Acta* 2013 Aug;1834(8):1648-1659.
- (15) Knaebel H, Seiler C, Büchler M. Bauchhöhle. In: Marre R, Battegay M, editors. Klinische Infektiologie. 2nd ed. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2008. p. 521-536.
- (16) Stock I. Bakteriologie. In: Stock I, editor. Bakterien, Viren, Wirkstoffe Eschborn: Govi-Verlag; 2009. p. 37-216.
- (17) Brodt H. Infektionen durch fakultativ pathogene Bakterien. In: Brodt H, editor. Antibiotika-Therapie. 12th ed. Stuttgart: Schattauer; 2013. p. 695-714.

- (18) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2012. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>. Accessed 09/10, 2013.
- (19) Sigge A, Essig A. Bakterien. In: Marre R, Battegay M, editors. *Klinische Infektiologie*. 2nd ed. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2008. p. 1125-1150.
- (20) Slonczewski J, Foster J. Umwelteinflüsse und die Kontrolle des mikrobiellen Wachstums. In: Slonczewski J, Foster J, editors. *Mikrobiologie*. 2nd ed. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum; 2012. p. 171-208.
- (21) Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. Gram-Negative Bacilli and Coccobacilli (MacConkey-Positive, Oxidase-Positive). In: Forbes B, Sahn D, Weissfeld A, editors. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. St. Louis, Mo.; London: Elsevier Mosby; 2007. p. 340-379.
- (22) European Medicines Agency. Zinforo. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002252/human_med_001584.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed 09/15, 2013.
- (23) Nation R, Li J. Polymyxins. In: Grayson M, Kucers A, editors. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. London: Hodder Arnold; 2011. p. 955-970.
- (24) Li J, Coulthard K, Milne R, Nation RL, Conway S, Peckham D, et al. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2003 Dec;52(6):987-992.
- (25) Wallace SJ, Li J, Rayner CR, Coulthard K, Nation RL. Stability of colistin methanesulphonate in pharmaceutical products and solutions for administration to patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Sep;52(9):3047-3051.
- (26) Wallace SJ, Li J, Nation RL, Prankerd RJ, Velkov T, Boyd BJ. Self-assembly behavior of colistin and its prodrug colistin methanesulphonate: implications for solution stability and solubilization. *J Phys Chem B* 2010 Apr 15;114(14):4836-4840.

- (27) Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 Nov;74(3):213-223.
- (28) Fachinformation zu Tadim (R) 1 Million I.E.-Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung. Available at: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/64/1-31164.pdf>. Accessed July 15, 2013.
- (29) Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-beta-1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Jan;56(1):59-69.
- (30) EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 3.1. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf. Accessed 09/24, 2013.
- (31) Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, et al. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis* 2011 Nov;53(9):879-884.
- (32) Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2009 Dec;22(6):535-543.
- (33) Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol* 2011 Nov;53(5):546-551.
- (34) Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 2010 Jul;65(7):1416-1423.

(35) McCoy KS. Compounded colistimethate as possible cause of fatal acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2007 Nov 29;357(22):2310-2311.

ANHANG

1) Versuchsprotokoll

Plättchendiffusionstest

1. Die Keimsuspensionen (McFarland 0,5) werden auf MHA-Platten ausgestrichen.
2. Eine Flasche Tadim[®] (80 mg CMS) wird mit 10 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. aufgelöst. Dies ergibt eine Konzentration von 8 mg/mL.
3. 0,125 mL dieser Lösung werden in 0,875 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. eingebracht um eine Konzentration von 1 mg/mL herzustellen.
4. 10 µL dieser Lösung (entsprechen 10 µg Tadim[®]) werden auf leere Testplättchen aufgebracht und dann auf die MHA-Platten aufgelegt. Die restliche Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.
5. Für einen Kontrollversuch wird zum Zeitpunkt 0 Stunden ein Colistin-Testplättchen mit 10 µg Colistin auf eine MHA-Platte gegeben.
6. Weitere 10 µL der hergestellten Tadim[®]-Verdünnung werden nach jeweils 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden entnommen und mit ihnen ebenso verfahren.
7. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank werden die Hemmhöfe abgelesen.

Der Versuch wird 3-fach durchgeführt.

Quantitative Kulturen

1. Es werden am Vortag Overnight-Kulturen von den ausgewählten Keimen hergestellt. Dazu wird 1 Bakterien-Kolonie in 1 mL Bouillon einer aeroben Blutkulturflasche eingebracht und für 16h inkubiert. Daraus ergibt sich eine Keimzahl von ca. $5 \cdot 10^8$ CFU/mL.
2. Tadim[®]-Lösungen werden 6 Stunden vor Versuchsbeginn hergestellt:
 - i) Eine Flasche Tadim[®] (80 mg CMS) wird mit 10 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. aufgelöst. Dies ergibt eine Konzentration von 8 mg/mL.
 - ii) Davon werden 0,05 mL bzw. 0,2 mL entnommen und mit 50 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. verdünnt. Es ergeben sich Tadim[®]-Lösungen von 8 bzw. 32 mg/L.
3. Zu Versuchsbeginn werden Verdünnungen der Overnight-Kultur erzeugt: 1 mL der Kultur wird mit 9 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. verdünnt, es ergeben sich folglich ca. $5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis eine Konzentration von ca. $5 \cdot 10^3$ CFU/mL resultiert.
4. Weitere Tadim[®]-Lösungen werden wie unter 2. hergestellt.
5. Danach wird jeweils 1 mL der verdünnten Overnight-Kultur mit 9 mL einer der Tadim[®]-Lösungen versetzt. Es ergeben sich folglich 4 Tadim[®]-Keim-Suspensionen mit einer Keimzahl von ca. $5 \cdot 10^2$ CFU/mL.
6. Nun wird wiederum für den Kontrollversuch 1 mL der verdünnten Overnight-Kultur entnommen und mit 9 mL 0,9%-iger NaCl-Lsg. versetzt. Daraus resultiert eine NaCl-Keim-Suspension mit ca. $5 \cdot 10^2$ CFU/mL.
7. 0,1 mL werden aus den Keim-Suspensionen entnommen und auf MHA-Platten aufgetragen.
8. Die Keim-Suspensionen werden bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die beimpften MHA-Platten werden für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

9. Nach 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden werden wieder aus den Keim-Suspensionen jeweils 0,1 mL entnommen und auf MHA-Platten aufgetragen.

10. Nach 24 h werden die entstandenen Kolonien abgelesen und auf die Keim-Suspensionen hochgerechnet.

Der Versuch wird 3-fach durchgeführt.

2) Messergebnisse

		Hemmhof-Durchmesser [mm]				
		Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3	Mittelwert	Standard-abweichung
Standzeit der Tadim-Lösung	0h	11	10	10	10,33	±0,58
	2h	11	11	11	11	±0
	4h	11	11	11	11	±0
	6h	12	12	12	12	±0
	8h	12	12	12	12	±0
	12h	12,5	12	12,5	12,33	±0,29
	24h	13	13	13	13	±0
Colistin		14	14	14	14	±0

Tabelle 5: *Klebsiella oxytoca*, Plättchendiffusionstest; Messwerte, arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen

		Hemmhof-Durchmesser [mm]				
		Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3	Mittelwert	Standard-abweichung
Standzeit der Tadim-Lösung	0h	9	8,5	9	8,83	±0,29
	2h	9	9	9	9	±0
	4h	10	10	10	10	±0
	6h	11	10,5	10,5	10,67	±0,29
	8h	10,5	10,5	11	10,67	±0,29
	12h	11,5	11	11,5	11,33	±0,29
	24h	11,5	11,5	11,5	11,5	±0
Colistin		13	14	14	13,67	±0,58

Tabelle 6: *Klebsiella pneumoniae*, Plättchendiffusionstest; Messwerte, arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen

		Hemmhof-Durchmesser [mm]				
		Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3	Mittelwert	Standardabweichung
Standzeit der Tadim-Lösung	0h	10	9,5	9	9,5	±0,5
	2h	10	10	10,5	10,17	±0,29
	4h	11	11	11	11	±0
	6h	11	11,5	11	11,17	±0,29
	8h	12	11,5	12	11,83	±0,29
	12h	12,5	12	11,5	12	±0,5
	24h	13,5	13	14	13,5	±0,5
Colistin		15	15	15	15	±0

Tabelle 7: *Pseudomonas aeruginosa*, Plättchendiffusionstest; Messwerte, arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen

Zeitintervall	Mittlere Zuwachsraten der Hemmhöfe [mm/h]		
	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0-2h	0,34	0,09	0,34
2-4h	0,00	0,50	0,42
4-6h	0,50	0,34	0,09
6-8h	0,00	0,00	0,33
8-12h	0,08	0,17	0,04
12-24h	0,06	0,01	0,13

Tabelle 8: Plättchendiffusionstest; mittlere Zuwachsraten der Hemmhöfe pro Stunde in den getesteten Zeitintervallen

		CFU/mL bei NaCl			
		Messwerte			MW ± SD
Standzeit der NaCl-Keim-Suspension	0h	240	350	290	293 ± 55
	2h	810	590	450	617 ± 181
	4h	390	650	280	440 ± 190
	6h	640	720	560	640 ± 80
	8h	420	450	470	447 ± 25
	12h	920	840	230	663 ± 377
	24h	890	660	370	640 ± 261

Tabelle 9: *Klebsiella pneumoniae*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.

		CFU/mL bei Tadim 8mg/L							
		Tadim-Lsg. frisch hergestellt				Tadim-Lsg. 6h gelagert			
		Messwerte			MW ± SD	Messwerte			MW ± SD
Standzeit der Tadim- Keim- Suspension	0h	240	430	220	297 ± 116	340	420	450	403 ± 57
	2h	610	370	600	527 ± 136	530	550	620	567 ± 47
	4h	550	540	410	500 ± 78	80	110	40	77 ± 35
	6h	650	550	490	563 ± 81	520	530	510	520 ± 10
	8h	390	200	150	247 ± 127	520	600	240	453 ± 189
	12h	310	130	420	287 ± 146	610	650	570	610 ± 40
	24h	450	570	740	587 ± 146	780	770	780	777 ± 6

Tabelle 10: *Klebsiella pneumoniae*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.

		CFU/mL bei Tadim 32mg/L							
		Tadim-Lsg. frisch hergestellt				Tadim-Lsg. 6h gelagert			
		Messwerte			MW ± SD	Messwerte			MW ± SD
Standzeit der Tadim- Keim- Suspension	0h	400	230	300	310 ± 85	670	750	770	730 ± 53
	2h	380	660	610	430 ± 210	240	140	240	207 ± 58
	4h	250	350	270	290 ± 53	40	60	80	60 ± 20
	6h	240	230	330	267 ± 55	150	190	150	163 ± 23
	8h	50	40	60	50 ± 10	90	50	130	90 ± 40
	12h	90	40	60	63 ± 25	40	20	40	33 ± 12
	24h	10	20	30	20 ± 10	40	20	0	20 ± 20

Tabelle 11: *Klebsiella pneumoniae*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.

		CFU/mL bei NaCl			
		NaCl			MW ± SD
Standzeit der NaCl- Keim- Suspension	0h	740	1040	340	707 ± 351
	2h	220	240	360	273 ± 76
	4h	290	310	270	290 ± 20
	6h	470	590	470	510 ± 69
	8h	120	120	280	173 ± 92
	12h	490	530	560	527 ± 35
	24h	270	160	280	237 ± 67

Tabelle 12: *Pseudomonas aeruginosa*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.

		CFU/mL bei Tadim 8 mg/L							
		Tadim-Lsg. frisch hergestellt				Tadim-Lsg. 6h gelagert			
		Messwerte			MW ± SD	Messwerte			MW ± SD
Standzeit der Tadim- Keim- Suspension	0h	790	640	440	623 ± 176	350	520	490	453 ± 91
	2h	270	240	200	237 ± 35	390	170	160	240 ± 130
	4h	170	230	200	200 ± 30	310	280	300	297 ± 15
	6h	450	610	470	510 ± 87	170	200	150	173 ± 25
	8h	180	150	70	133 ± 57	90	130	170	130 ± 40
	12h	280	330	250	287 ± 40	550	520	420	497 ± 68
	24h	110	180	110	133 ± 40	20	130	350	167 ± 168

Tabelle 13: *Pseudomonas aeruginosa*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.

		CFU/mL bei Tadim 32 mg/L							
		Tadim-Lsg. frisch hergestellt				Tadim-Lsg. 6h gelagert			
		Messwerte			MW ± SD	Messwerte			MW ± SD
Standzeit der Tadim- Keim- Suspension	0h	640	710	730	693 ± 47	750	610	450	603 ± 150
	2h	310	330	250	297 ± 42	160	270	300	243 ± 74
	4h	170	180	120	157 ± 32	200	120	140	153 ± 42
	6h	450	300	290	347 ± 90	250	210	200	220 ± 26
	8h	290	270	340	300 ± 36	140	110	120	123 ± 15
	12h	440	170	170	260 ± 156	370	270	270	303 ± 58
	24h	30	40	30	33 ± 6	10	10	0	7 ± 6

Tabelle 14: *Pseudomonas aeruginosa*, quantitative Kulturen; einzelne Messwerte und Mittelwerte plus Standardabweichungen.