

Aus der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Resistenzentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* gegen
Tobramycin und Colistin bei Patienten mit Mukoviszidose unter
Suppressionstherapie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg



vorgelegt von Stephan Horn

aus Esslingen

Würzburg, im Juli 2018

Referent: Herr Professor Dr. med. Helge Hebestreit

Korreferent: Herr PD Dr. rer. nat. Dr. med. Christoph Schoen

Dekan: Herr Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen
Prüfung: 07.12.2018

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern und Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mukoviszidose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	1
1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild	6
1.1.4 Erregerspektrum	6
1.1.5 Mikrobiologische Diagnostik	7
1.1.6 Therapie	8
1.1.6.1 Eradikationstherapie	8
1.1.6.2 Suppressionstherapie	10
1.1.6.2.1 Durchführung	10
1.1.6.2.2 Inhalation mit Tobramycin	11
1.1.6.2.3 Inhalation mit Colistin	13
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.2.1 Erreger	15
1.2.2 Pathogenese	16
1.2.3 Pathomechanismen	18
1.2.3.1 Phänotypische Anpassung	18
1.2.3.2 Alginatbildung	19
1.2.3.3 Biofilmbildung	21
1.2.3.4 Quorum sensing	22
1.2.3.5 Resistenzentwicklung	24
1.2.3.5.1 Resistenz gegen Tobramycin	24
1.2.3.5.2 Resistenz gegen Colistin	27
2. Fragestellung	29
3. Patienten, Material und Untersuchungsmethoden	31
3.1 Studiendesign	31
3.2 Patienten	31

3.3	Eradikationstherapie	32
3.4	Suppressionstherapie	33
3.5	Mikrobiologische Diagnostik	33
3.5.1	Probengewinnung	33
3.5.2	Probentransport	34
3.5.3	Probenverarbeitung	34
3.5.4	Kulturelle Anzüchtung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
3.5.5	Erregeridentifikation	36
3.5.6	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
3.5.6.1	Agardiffusionstest	37
3.5.6.2	Minimale Hemmkonzentration mittels Mikrodilution	38
3.5.6.3	Epsilon-Test (Etest®)	39
3.5.6.4	Empfindlichkeitsprüfung von Tobramycin	39
3.5.6.5	Empfindlichkeitsprüfung von Colistin	40
3.5.6.6	Validität der routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfung	40
3.5.7	Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse	41
3.5.8	Statistische Methoden	41
4.	Ergebnisse	43
4.1	Patienten	43
4.1.1	Diagnosestellung Mukoviszidose	43
4.1.2	Erstnachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
4.1.3	Eradikationstherapie	45
4.1.4	Suppressionstherapie bei chronischer Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i>	46
4.2	Mikrobiologische Ergebnisse	46
4.2.1	Besiedlungsrate mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
4.2.2	Morphologie der <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -Isolate	47
4.2.2.1	Mukoide Stämme	47
4.2.3	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
4.2.3.1	Validität der routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfung	48
4.2.4	Resistenz von <i>P. aeruginosa</i> gegen Tobramycin und Colistin	49

4.2.4.1	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -Isolate	49
4.2.4.1.1	Resistenz gegen Tobramycin	49
4.2.4.1.2	Resistenz gegen Colistin	51
4.2.4.2	Patienten	51
4.2.5	Einfluss auf die Tobramycin-Resistenzentwicklung	54
4.2.5.1	Lebensalter bei Erstbesiedlung	54
4.2.5.2	Lebensalter bei Nachweis der Tobramycin-Resistenz	54
4.2.5.3	Lebensalter bei Beginn der Suppressionstherapie	56
4.2.5.4	Dauer der Suppressionstherapie	56
4.2.5.5	Dauer der Inhalationstherapie mit Tobramycin bzw. Colistin	57
4.2.5.6	Dauer der parenteralen Antibiotikatherapie (Zahl der Zyklen)	57
4.2.5.7	Zusammenfassung der Einflüsse auf die Resistenzentwicklung	58
4.3	Molekulargenetische Untersuchungen (Genotypisierung)	59
4.3.1	Genotypen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
4.3.2	Übertragung von resistenten <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> - Stämmen	61
5.	Diskussion	63
5.1	Patienten	63
5.1.1	Diagnosestellung und Erstnachweis von <i>P. aeruginosa</i>	64
5.1.2	Eradikationstherapie	65
5.1.3	Suppressionstherapie	65
5.1.4	Inhalationstherapie	65
5.2	Besiedlung mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
5.2.1	Besiedlungsrate	66
5.2.2	Phänotypen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
5.2.2.1	Nicht-mukoide Stämme	67
5.2.2.2	Mukoide Stämme	68
5.2.3	Genotypen (Klone) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
5.3	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
5.3.1	Tobramycin	70
5.3.2	Colistin	70

5.4	Resistenzentwicklung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
5.4.1	Inhalationstherapie	72
5.4.1.1	Resistenzentwicklung gegen Tobramycin	72
5.4.1.2	Resistenzentwicklung gegen Colistin	73
5.4.2	Parenterale Tobramycin-Therapie	75
5.5	Einflüsse auf die Tobramycin-Resistenzentwicklung unter Suppressionstherapie	76
5.6	Übertragung von resistenten <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> - Stämmen	77
5.7	Grenzen der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik	78
5.8	Ausblick	79
6. Zusammenfassung		82
7. Literaturverzeichnis		84

Anhang

Publikation der Arbeit

Abkürzungen

Formblatt zur Erfassung der Patientendaten

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose (lat.: „mucus“ = Schleim; „viscidus“ = zäh), auch zystische Fibrose (englisch „cystic fibrosis“, CF) genannt, ist eine hereditäre Stoffwechselstörung, die als Multiorganerkrankung auftritt, da alle exokrinen Drüsen des Körpers betroffen sind.

1.1.1 Epidemiologie

Die Mukoviszidose ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte angeborene Stoffwechselerkrankung in Europa und betrifft laut WHO einen von 3.300 Lebendgeborenen. Etwa jeder 40. bis 50. Mitteleuropäer ist heterozygoter, asymptomatischer Merkmalsträger [1]. In Deutschland leben ca. 8.000 betroffene Menschen [2], pro Jahr werden zudem etwa 200 Kinder mit Mukoviszidose geboren. Durch große Fortschritte in Diagnostik und Therapie hat sich die mittlere Überlebenserwartung heute auf ca. 40,1 Jahre erhöht.

1.1.2 Pathogenese

Die Mukoviszidose wird durch Mutationen in einem einzigen Gen, dem cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*cftr*)-Gen, verursacht [3]. Dieses ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (Position 7q31) lokalisiert und kodiert für ein membranständiges Glykoprotein, auch Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator oder Transmembranleitfähigkeit-Regulator (CFTR) genannt. CFTR ist ein Kanal für negativ geladene Ionen wie Chlorid- (Cl^-) oder Hydrogencarbonationen (HCO_3^-), beeinflusst aber auch andere Ionenkanäle auf der Zelloberfläche wie z.B. den epithelialen Natriumkanal (ENaC). CFTR kommt in allen Organen mit epithelialer Oberfläche vor wie z. B. in den Atemwegen des oberen und unteren Respirationstrakts, in den Ausführungsgängen der Bauchspeicheldrüse u. a.

Bei Gesunden transportiert CFTR Chloridionen aus der Zelle, denen zum Ausgleich des osmotischen Drucks Wasser folgt. Die Natrium-Kanäle ENaC bringen Natrium von der Zelloberfläche in die Zelle, ebenfalls gefolgt von Wasser.

Durch die gute Abstimmung der beiden Transportvorgänge ist der Wassergehalt des sich auf der Oberfläche der Gangsysteme befindlichen Mukus optimal reguliert (Abbildung 1).

Bei Patienten mit CF ist der Chlorid-Kanal durch einen genetischen Defekt im *cftr*-Gen gestört [4]. In den Epithelzellen treten Störungen des Kochsalz- und Wassertransports auf. Es kommt zu einer Einschränkung des Chlorid- und Wassertransports aus der Zelle; das führt zu einem Wassermangel auf der Zelloberfläche. Gleichzeitig kommt es durch eine Störung des Natrium-Kanals zu einem gesteigerten Natrium- und Wassertransport von der Zelloberfläche in die Zelle [5, 6]. Der zusätzliche Wasserentzug führt zu Zähflüssigkeit der Sekrete. Klinisch am relevantesten ist die Erkrankung im Respirationstrakt (Lunge).

Abbildung 1. Wasser- und Ionentransport bei Gesunden (links) und Patienten mit CF (rechts)

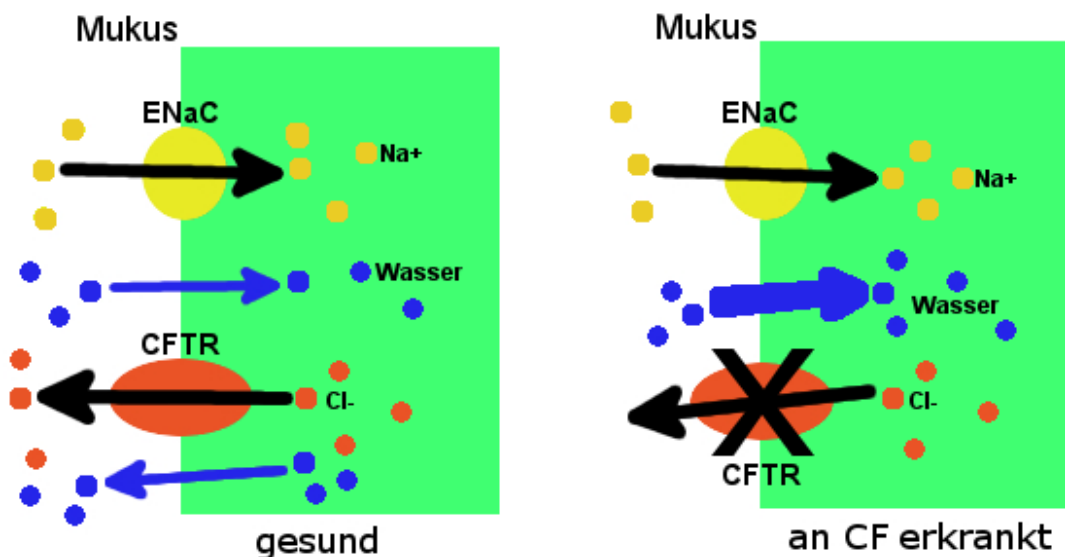


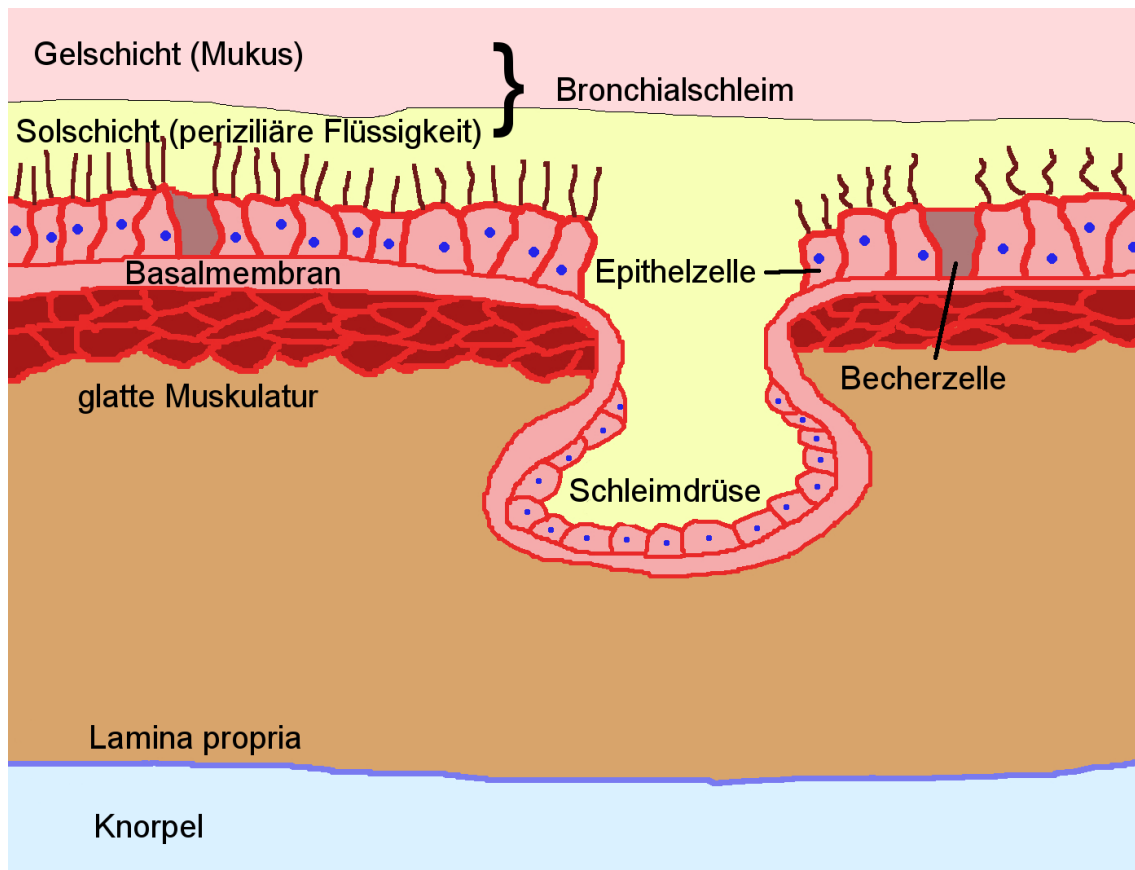
Abbildung links: Wasser- und Ionentransport beim Gesunden. Dem Mukus auf der Zelloberfläche (außen) wird Wasser durch den Chloridkanal CFTR zugeführt und Wasser durch den Natriumkanal ENaC entzogen. Beide Transportvorgänge sind gut aufeinander abgestimmt.

Abbildung rechts: Gestörter Wasser- und Ionentransport bei Patienten mit CF. Durch einen genetischen Defekt des CFTR wird dem Mukus kein Wasser aus der Zelle zugeführt, gleichzeitig erfolgt durch ENaC die Natriumionen-Hyperabsorption in die Zelle wodurch dem Mukus zusätzlich viel Wasser entzogen wird.

Modifiziert nach Prof. Dr. Wolf-Michael Weber, Institut für Membranphysiologie, WWU Münster

Im Lungenepithel ist die luminalen Zelloberfläche mit einem zweischichtigen Bronchialschleim belegt (Abbildung 2).

Abbildung 2. Lungenepithelzelle bei gesunden Patienten

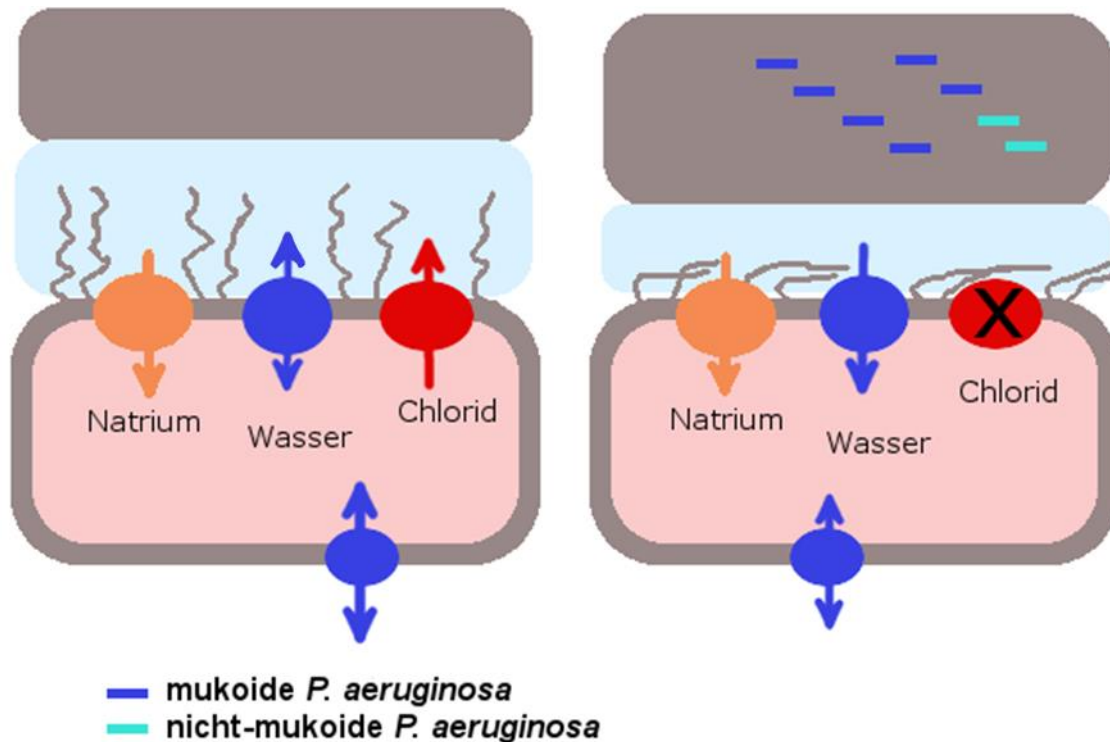


modifiziert nach Oakland und Mitarbeiter 2012 [7]

Der zweischichtige Bronchialschleim besteht aus einer basalen dünnflüssigen, die Flimmerhärchen umgebenden Solschicht und einer apikalen viskösen Gelschicht (Abbildung 2); durch oben geschilderten Pathomechanismus kommt es vor allem zu einem Wasserentzug in der Solschicht (periziliäre Flüssigkeit) [7]. Die Flimmerhärchen können den Schleim nicht mehr bewegen, es kommt zum Funktionsverlust (Abbildung 3).

Dazu kommt eine gesteigerte Schleimproduktion aus den zwischen dem Epithel liegenden Becherzellen. Aufgrund des Wassermangels dickt der Schleim ein, die mukoziliäre Clearance kommt zum Erliegen und die Besiedlung des Mucus mit pathogenen Erregern wird erleichtert [8]. Diese Vorgänge rufen entzündliche Reaktionen, wie die frühe Rekrutierung von Entzündungsmediatoren (z. B. polymorphkernige Leukozyten), hervor. Im weiteren Verlauf wird das betroffene Gewebe zerstört.

Abbildung 3. Lungenepithelzelle bei Gesunden (links) und bei Patienten mit CF (rechts)



grau und hellblau: zweischichtiger Bronchialschleim auf der Zelloberfläche; hellblau: periziliäre Flüssigkeit, grau: Mukus, rosa: Epithelzelle; modifiziert nach Williams und Mitarbeiter 2010 [9]

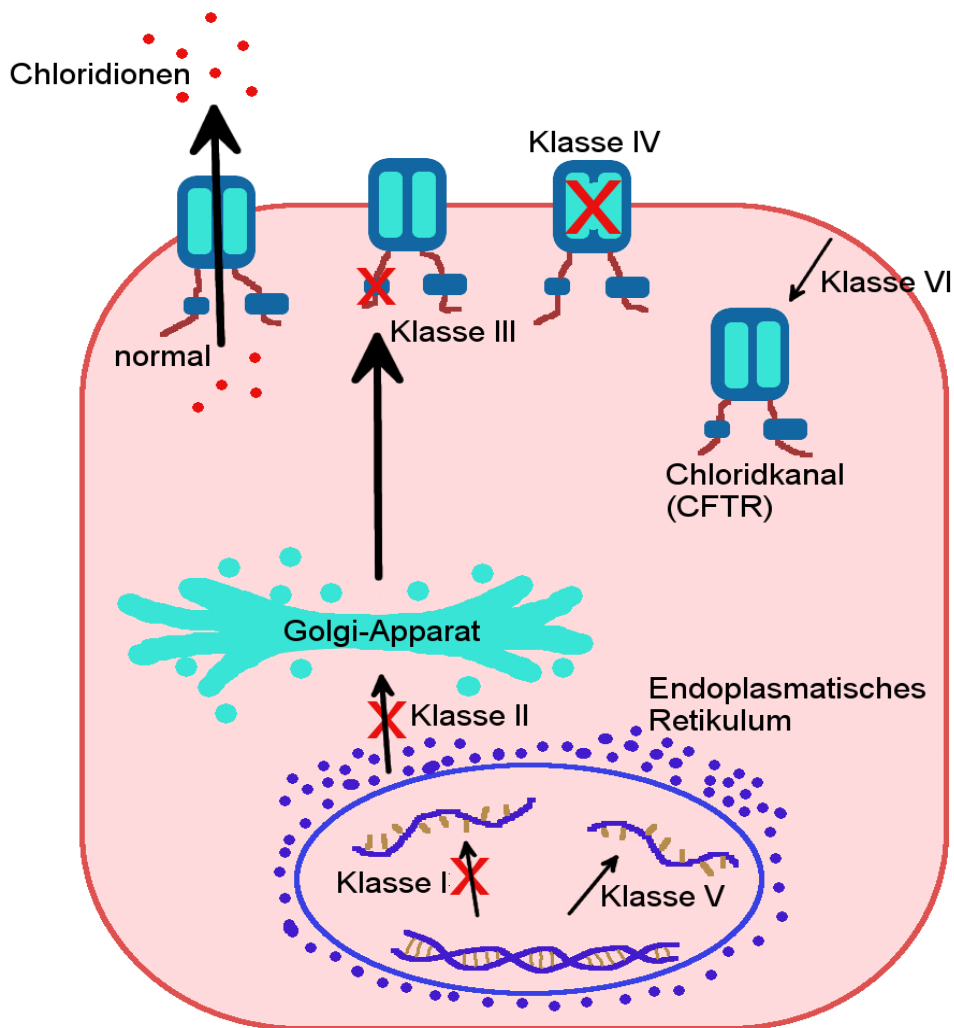
Bis heute sind ca. 2.500 Mutationen (cystic fibrosis mutation database) beschrieben.

Dabei handelt es sich am häufigsten um Punktmutationen (in 39,7 % der Fälle). Die häufigste Mutation findet sich auf Position 508 des CFTR-Proteins ($\Delta F508$, F508del) und betrifft ca. 70% der Patienten mit CF. Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 3 Basenpaaren, so dass die Aminosäure Phenylalanin an der Position 508 im CFTR fehlt [10].

Die Mutationen und die damit ausgelösten Störungen werden in 6 Klassen unterteilt [4, 11] (Abbildung 4).

Klasse I: Die Mutation führt zu einem Abbruch der Transkription der mRNA, so dass keine Synthese von CFTR erfolgen kann. **Klasse II:** Die Mutation führt zu einem Protein mit falscher Tertiärstruktur (Faltung). Das Protein wird als falsch erkannt und vor Einbau in die Zellmembran zerstört.

Abbildung 4. Mutationsklassen bei Mukoviszidose



modifiziert nach Rowe und Mitarbeiter 2005 [4].

Klasse III: Diese Mutation führt zu einer Störung der ATP-abhängigen Kanalöffnung. CFTR wird zwar vollständig gebildet und in die Zellmembran eingebaut, der Chloridkanal ist aber nicht funktionsfähig, da er sich nicht öffnen lässt. **Klasse IV:** CFTR wird vollständig synthetisiert und in die Zellwand eingebaut, seine Durchlässigkeit für Chloridionen ist aber stark eingeschränkt. **Klasse V:** Es wird zu wenig CFTR produziert. **Klasse VI:** CFTR wird synthetisiert, seine Halbwertszeit und damit seine Stabilität ist aber reduziert, so dass er im Zytoplasma abgebaut wird.

Am häufigsten sind die Mutationsklassen I - III; die dadurch verursachten Krankheitsbilder gelten als schwer und gehen auch mit einer

Pankreasinsuffizienz einher. Die Klassen IV - VI zeigen einen leichteren Krankheitsverlauf. Die Kenntnis der Mutationsklasse ist wichtig, um den Verlauf der Erkrankung ungefähr einschätzen zu können [12].

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Die Mukoviszidose manifestiert sich vor allem im Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Die Kardinalsymptome sind Dyspnoe, chronischer Husten, exokrine Pankreasinsuffizienz und chronische Hepatopathie [1].

Das Krankheitsbild und der Verlauf der Erkrankung werden vom Mutationstyp und von zahlreichen exogenen Einflussgrößen geprägt, die Symptome der Erkrankung können daher individuell sehr unterschiedlich sein. In Deutschland kommen am häufigsten Mutationen der Klasse II vor. Diese führen früh im Kindesalter zu klinischen Symptomen; im Vordergrund stehen Maldigestion und chronische Bronchitis.

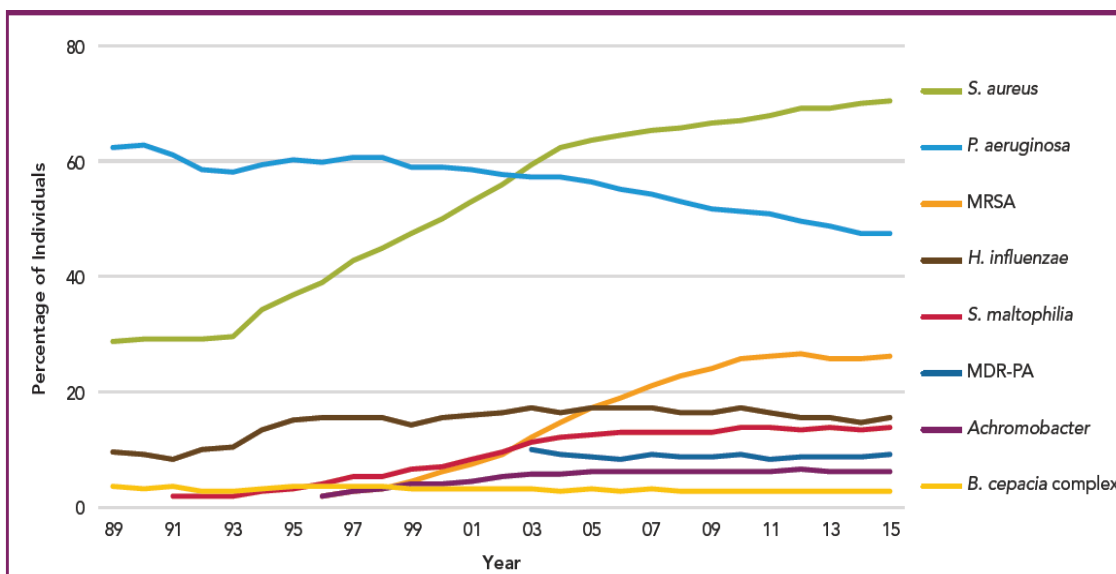
Die chronische Lungenerkrankung führt zu einer obstruktiv-restriktiven Funktionsstörung mit Überblähung, Emphysemen und Atelektasen, ferner zur Bildung von zentralen und peripheren Bronchiektasen, die sich mit eitrigen Sekreten füllen und das Keimreservoir für rezidivierende Pneumonien bilden. Die Infektionen zerstören das Lungengewebe mit der Folge einer fortschreitenden respiratorischen Insuffizienz.

1.1.4 Erregerspektrum

Die Veränderungen im Respirationstrakt der Patienten mit CF begünstigen die Besiedlung der oberen und unteren Atemwege mit für die CF charakteristischen pathogenen Keimen. Bei Kindern stehen *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* im Vordergrund. Mit zunehmendem Alter nimmt die Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) als dominierendem Erreger zu (Abbildung 5). In wenigen Fällen können Bakterien des *Burkholderia-cepacia*-Komplexes vorkommen, die mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert sind. Ferner kommen *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp., *Inquilinus limosus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Alcaligenes* spp. vor. Darüber hinaus werden auch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM), Enterobacterales und Pilze gefunden [13]. Zu den viralen Erregern zählen

Rhinoviren, Adenoviren, Respiratory-Syncytial-Virus (RSV), Parainfluenza und Influenzaviren [14, 15] (Abbildung 5).

Abbildung 5. Mikroorganismen im Respirationstrakt von Patienten mit CF (1989 - 2015)



Quelle: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2015

In den letzten Jahren hat sich an manchen Zentren das Erregerspektrum der Patienten mit CF verändert. Es kam zu einer Zunahme der Besiedlung mit *S. aureus* einschließlich MRSA, während die Besiedlungsraten mit PA leicht zurückgegangen sind. In diesen Zentren ist *S. aureus* vor PA an die erste Stelle der kolonisierenden Bakterien getreten [16, 17].

Trotz stark inflammatorischer Reaktionen und aggressiver antibiotischer Therapie persistiert PA in den Atemwegen von Patienten mit CF und führt nach 20 bis 30 Jahren zu chronischen Infektionen mit respiratorischer Insuffizienz.

1.1.5 Mikrobiologische Diagnostik

Bei dringendem Verdacht auf eine Mukoviszidose sollte der Nachweis einer CFTR-Funktionsstörung erbracht werden (S2k-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“) [18]. Im positiven Fall werden die Patienten in Spezialambulanzen (Mukoviszidose-Ambulanzen) in regelmäßigen Abständen betreut (i. d. R. vierteljährlich). Mikrobiologische Proben (Rachenabstriche bei Kindern oder Sputa bei Erwachsenen) sollen mindestens sechsmal im Jahr zur

Ermittlung des Keimspektrums entnommen werden [18]. Die mikrobiologische Untersuchung der Proben erfolgt leitliniengerecht [19] in Form einer Stufendiagnostik (siehe Abbildung 17).

1.1.6 Therapie

Die Therapie bei Patienten mit CF setzt sich zusammen aus Physiotherapie, Sport, geeigneter Ernährung und der parenteralen antibiotischen Behandlung akuter und chronischer bronchopulmonaler Infektionen sowie der Inhalationstherapie bei chronischen PA-Infektionen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Therapeutischer Ansatz bei Mukoviszidose

Therapeutischer Ansatz	Wirkstoff	Applikation
Sekretolytika	NaCl (0,9-7 %), Dornase alfa, Mannitol	p.i.
	Acetylcystein	p.o., p.i.
Antiinflammatorische Substanzen	Azithromycin	p.o.
	Ibuprofen	p.o.
Bronchodilatoren	β-Mimetika	p.i.
Antibiotika für die systemische Therapie	<i>Pseudomonas</i> -wirksame Antibiotika: Aztreonam, Cefepim, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Meropenem, Piperacillin-Tazobactam, Amikacin, Tobramycin	p.o., i.v.
Antibiotika zur Inhalationstherapie	Colistin, Tobramycin, Aztreonam, Levofloxacin	p.i.

p.i. = per inhalationem; p. o. = per os; i. v. = intravenös; modifiziert nach Schwarz und Staab 2015 [20]

Einen wichtigen Stellenwert nehmen die Verflüssigung des zähen Schleims und die Verbesserung der mukoziliären Clearance ein [21]. Durch diese sekretolytische, antiinflammatorische und antiinfektive Therapie sollen der Gasaustausch in der Lunge verbessert und die Bakterienbesiedlung in den Atemwegen vermindert werden (Tabelle 1).

1.1.6.1 Eradikationstherapie

Im Frühstadium der Erkrankung werden akute Infektionen der Lunge, die nicht

durch PA verursacht sind, nach Erregernachweis gezielt oral oder parenteral mit Antibiotika (Monotherapie) behandelt, z. B. *H. influenzae* mit Amoxicillin.

Kommt es im weiteren Verlauf zu einer Besiedlung oder Infektion mit PA, so wird beim Erstnachweis sofort eine Eradikationstherapie eingeleitet, um die planktonischen Stämme abzutöten und die Biofilmbildung zu verhindern oder hinauszuzögern [22]. Die Eradikationstherapie besteht aus einer Inhalationstherapie mit Tobramycin oder Colistin ± einer oralen Therapie mit Ciprofloxacin. Sie basiert auf den Ergebnissen einer Cochrane-Analyse [23]. Diese konnte zeigen, dass bei der frühen Infektion mit PA eine Eradikationstherapie erfolgreich für das Erzielen einer Keimelimination ist. Ihre Effektivität gilt als gesichert [24]. Nach den Empfehlungen der S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“ [25] kann die Eradikationstherapie auf verschiedene Weise durchgeführt werden:

1. Eradikationszyklus:

ohne Exazerbation:

- a) Tobramycin inhalativ (2 x 300 mg) über 4 Wochen
- b) Ciprofloxacin per os (2 x 750 mg bei Erwachsenen)
plus Colistin inhalativ (2 x 1 oder 3 x 1 Mio IE) über 3 Wochen

mit Exazerbation:

parenterale Therapie mit PA-wirksamen Antibiotika über 14 Tage, gefolgt von einer Inhalationstherapie mit

- a) Colistin (2 x 1 oder 3 x 1 Mio IE) über 3 Wochen oder mit
- b) Tobramycin (2 x 300 mg) über 4 Wochen

2. Eradikationszyklus (bei Nicht-Erfolg des 1. Eradikationszyklus):

parenterale Therapie mit PA-wirksamen Antibiotika über 14 Tage, gefolgt von einer Therapie mit

- a) Ciprofloxacin per os (2 x 750 mg bei Erwachsenen)
plus Colistin inhalativ (3 x 2 Mio IE) über 3 Monate oder mit
- b) Tobramycin inhalativ (2 x 300 mg) über 4 Wochen

3. Eradikationszyklus (bei Nicht-Erfolg des 2. Eradikationszyklus):

Ausdehnung der inhalativen Therapie auf drei Monate.

Von einer erfolgreichen Eradikation wird ausgegangen, wenn in drei konsekutiven Proben aus Atemwegsekreten in einem Gesamtzeitraum von sechs Monaten PA nicht mehr nachweisbar ist [25]. Eine Keimeradikation gelingt in der frühen Besiedlungsphase durchschnittlich bei etwa 80% der Patienten [22].

1.1.6.2 Suppressionstherapie

Die Suppressionstherapie setzt sich zusammen aus einer Inhalationstherapie mit Tobramycin, Colistin oder neuerdings auch mit Levofloxacinlösung oder Aztreonamlysin ± einer oralen Therapie mit Ciprofloxacin.

1.1.6.2.1 Durchführung

Gelingt die frühzeitige Keimelimination nicht, kommt es zu einer chronischen Infektion. Eine chronische Infektion ist gegeben, wenn innerhalb eines Jahres 50% oder mehr der untersuchten Proben (mindestens sechs) PA-positiv sind. Sobald der Patient mit PA chronisch infiziert ist, können durch eine antibiotische Suppressionstherapie der klinische Zustand gebessert und die hohe Dichte von PA im Sputum von 10^7 - 10^9 KBE/mL um 3 - 5 \log_{10} -Stufen reduziert werden; eine Eradikation von PA auf lange Sicht ist aber nicht mehr möglich [26].

Die Suppressionstherapie wird lebenslang durchgeführt. Sie kann erfolgen oral, parenteral, inhalativ oder in Kombination inhalativer mit oralen und/oder parenteralen Antibiotika [27]. Bei einer Exazerbation sollte zusätzlich eine systemische Antibiotikatherapie erfolgen. Bei leichtem Verlauf wird ein orales Antibiotikum eingesetzt, z. B. Ciprofloxacin über maximal 3 Wochen. Schwere Exazerbationen werden parenteral mit PA-wirksamen Antibiotika üblicherweise in einer Zweifach-Kombination (i. d. R. Betalaktame plus Tobramycin) über mindestens 2 Wochen behandelt (siehe Tabelle 1).

Die lebenslange Suppressionstherapie hält die Lungenfunktion entweder über einen langen Zeitraum stabil oder führt zu einer verzögerten Verschlechterung; sie verlängert das Leben der Patienten mit CF um viele Jahre. Zu den Nebenwirkungen gehören die Resistenzentwicklung gegen die applizierten

Antibiotika [28] und eine hohe Rate an Allergien gegen Beta-Laktamantibiotika [29]. Die Suppressionstherapie wird in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung durchgeführt. Bei schwerem Verlauf (Klasse I - III) erhalten die Patienten alle 3 bis 4 Monate eine 14-tägige parenterale Therapie mit PA-wirksamen Antibiotika (i. d. R. Zweifachkombination) und im Anschluss daran eine Inhalationstherapie.

Die Inhalationstherapie ist auf verschiedene Weise möglich [27]:

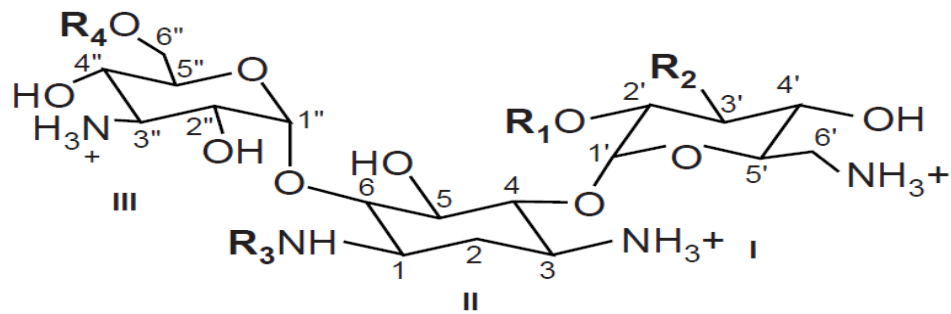
1. Inhalation mit Tobramycin (2 x 300 mg) im on/off Zyklus (4 Wochen Inhalation, dann 4 Wochen Pause),
2. tägliche Inhalation mit Colistin (2 - 3 x 1 oder 2 x 2 Mio IE) über das gesamte Intervall bis zum nächsten parenteralen Therapiezyklus ggf. in Kombination mit Ciprofloxacin über 4 Wochen (2 x 750 mg p.o. bei Erwachsenen),
3. alternierende Inhalation mit Tobramycin (2 x 300 mg) und Colistin (2 x 2 Mio IE) im monatlichen Wechsel,
4. Inhalation mit Aztreonamlysin (3 x 75 mg),
5. Levofloxacin (2 x 240 mg) als Inhalationslösung (ab dem 18 Lebensjahr).

Abweichungen von dem genannten Therapieregime sind nach dem Ermessen des behandelten Arztes möglich.

1.1.6.2.2 Inhalation mit Tobramycin

Aminoglykoside stellen stark positiv geladene (kationische) Pseudo-Polysaccharide mit Aminozuckern dar. Für die parenterale Therapie der Patienten mit CF sind Gentamicin, Tobramycin und Amikacin von Bedeutung, für die Inhalationstherapie spielt Tobramycin die größte Rolle. Die Aminoglykoside weisen chemisch das gleiche Grundgerüst auf, unterscheiden sich aber in der Zahl der Substituenten (R₁ - R₄) und in der Anordnung der Aminogruppen (NH₂-Gruppen) und Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) am Aminoglykosid-Grundgerüst (Abbildung 6). Sie wirken bakterizid und erfassen ein großes Spektrum an grampositiven und gramnegativen Bakterien, einschließlich PA.

Abbildung 6. Grundgerüst der Aminoglykoside

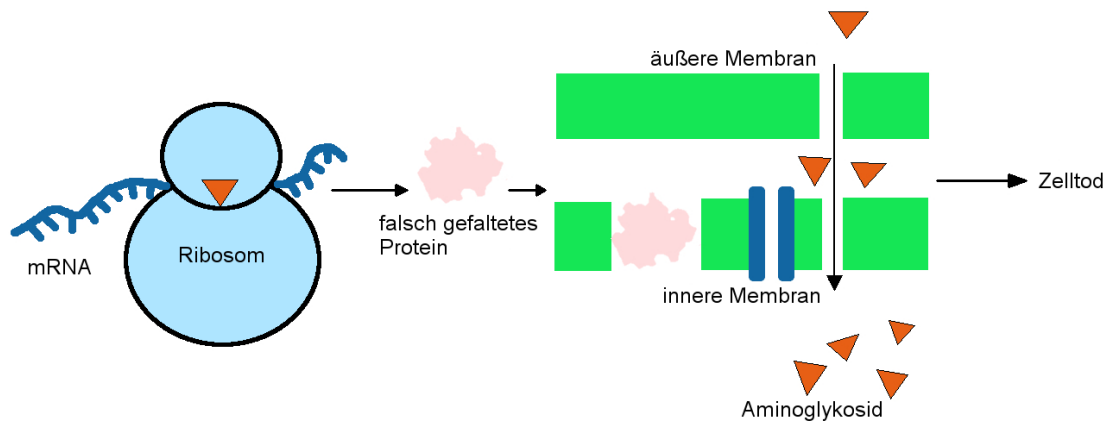


modifiziert nach Magalhaes und Blanchard 2009 [30]

Wirkungsmechanismus gegen gramnegative Bakterien

Die positiv geladenen Aminoglykoside (AG) reagieren zunächst mit den negativ geladenen Lipopolysacchariden (LPS) der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und verdrängen kompetitiv die Magnesiumionen (Mg^{2+}), welche die Zellwand stabilisieren. Es kommt zur Zerstörung der Zellwand, zu einer vergrößerten Permeabilität und zur Zunahme der Aminoglykosid-Aufnahme in die Zelle [30]. Dort inhibieren die Aminoglykoside die Proteinsynthese durch Bindung an die Aminoacyl-t-RNA-Akzeptorseite auf der 16S rRNA. Sie vergrößern zum einen die Bindungsstabilität der passenden Aminoacyl-t-RNA zur 30 S Untereinheit des Ribosoms, zum anderen kann „nicht-passende“ t-RNA ins Peptidyltransferase-Zentrum eintreten [31]. Es kommt zur Bildung von Proteinen mit falscher Tertiärstruktur. Diese Proteine werden in die Zellmembran eingelagert. Dort bilden sie Kanäle, die einen größeren Influx an Aminoglykosiden in die Zelle erlauben. Die hohe Konzentration von Aminoglykosiden führt zu einer kompletten Hemmung der Proteinsynthese mit Zelltod [32]. In mukoiden Stämmen ist die Tobramycin-Wirksamkeit herabgesetzt, da die im Biofilm vorkommenden Calciumionen Tobramycin hemmen (Chelatbildung), so dass Tobramycin seine Wirkung nicht mehr ausreichend entfalten kann (Abbildung 7).

Abbildung 7. Wirkungsmechanismus der Aminoglykoside



modifiziert nach Kohanski und Mitarbeiter 2010 [32]

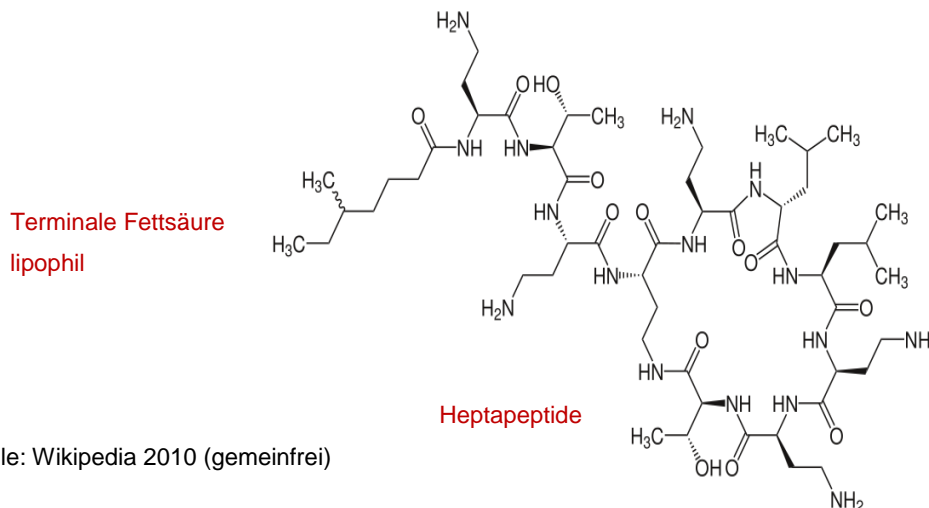
1.1.6.2.3 Inhalation mit Colistin

Colistin gehört zur Antibiotikaklasse der Polymyxine (Polymyxin E, Polymyxin B). Diese sind Stoffwechselprodukte von *Paenibacillus polymyxa*, einem im Erdboden und in Wurzeln vorkommenden Bakterium; chemisch handelt es sich um cyclische Heptapeptide mit einem Tripeptid als Seitenkette, an deren NH-terminalem Ende sich eine verzweigte Fettsäure befindet (Abbildung 8). Das D-Leucin im Polymyxin E ist durch das D-Phenylalanin im Polymyxin B ersetzt. Unter dem Namen Colistin (Polymyxin E) werden zwei chemisch unterschiedliche Substanzen vertrieben: Colistinsulfat zur oralen und topischen Anwendung und Colistinmethansulfat, das als Colistimethat-Natrium (CMS-Natrium) in Deutschland im Handel ist. CMS-Natrium steht zur parenteralen und inhalativen Anwendung zur Verfügung. CMS-Natrium enthält kein Colistin, sondern ist dessen chemisches Derivat (chemische Verbindung, die durch Sulfomethylierung aus Colistin entstanden ist). Die Substanz besitzt keine antimikrobielle Aktivität. Im wässrigen Milieu werden die Sulfomethylgruppen schrittweise abgespalten, und es entsteht neben verschiedenen Intermediaten das wirksame Colistin [33]. Polymyxin B wird wegen ausgeprägter Nebenwirkungen, u. a. Histaminfreisetzung mit nachfolgendem Bronchospasmus bei Applikation als Aerosol, nicht zur Inhalation verwendet.

Polymyxine sind bakterizide Substanzen und mit wenigen Ausnahmen wie *Burkholderia* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp. nur gegen gramnegative Bakterien

wirksam. Die bakterizide Wirkung unterliegt einem starken Inokulumeffekt, d. h. bei großer Keimkonzentration (Inokulum) ist die Wirkung schwächer, die MHK-Werte steigen an.

Abbildung 8. Strukturformel von Colistin



Quelle: Wikipedia 2010 (gemeinfrei)

Wirkungsmechanismus

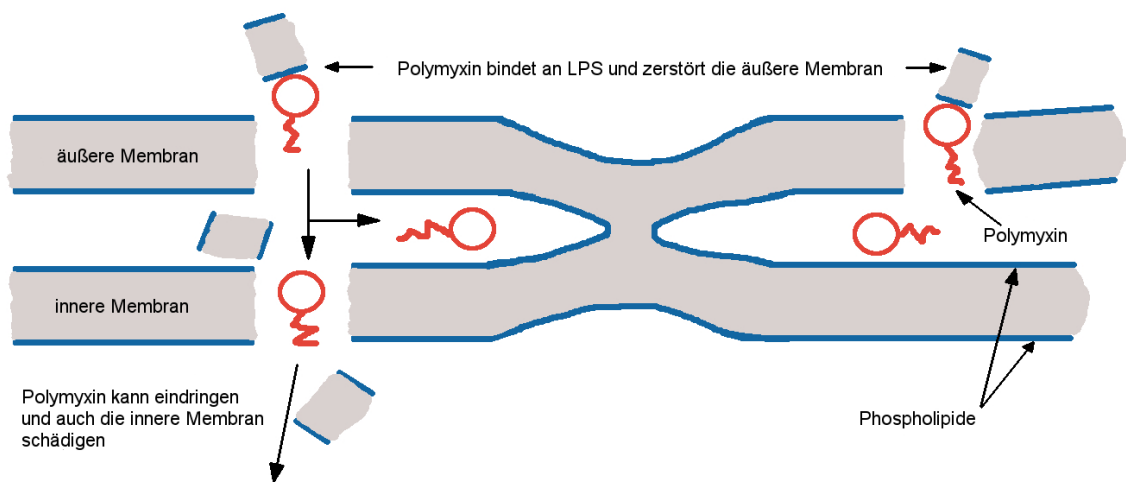
Durch Protonierung von freien Aminen (z. B. NH_2 zu NH_3^+), die sich am Peptidanteil des Polymyxins befinden (Abbildung 8), kommt es bei physiologischem pH-Wert zu einer elektrostatischen Anziehung an die anionischen, negativ geladenen Sauerstoffionen (O^{2-}) der Lipid-A-Phosphate in der äußeren Zellwandmembran gramnegativer Bakterien.

Daraus resultiert eine Verdrängung von Calciumionen (Ca^{2+}) und Magnesiumionen (Mg^{2+}), die das LPS-Geflecht der Bakterienzellwand in der äußeren Membran (OM) stabilisieren.

Nachdem diese elektrostatische Interaktion stattgefunden hat, kann sich das hydrophobe N-terminale Fettsäureende des Polymyxins in die äußere Zellwandmembran schieben. Hierdurch wird die Integrität der äußeren Membran geschwächt und es können Polymyxinmoleküle diese durchdringen. Der gleiche Mechanismus zerstört dann auch die innere Membran, wodurch es zu einer Lyse dieser und zum Zelltod kommt [34, 35]. Die Einlagerung des Antibiotikums zwischen die Phospholipide der Zytoplasmamembran führt zudem zu einem Verlust der Membranintegrität und zu einer Fusion der inneren (IM) und äußeren Zellwandmembran (OM) (Abbildung 9). Das induziert einen

Phospholipidaustausch, der zu einer osmotischen Imbalance und zum Zelltod führt [36]. Letztendlich ist der Mechanismus eine Reaktion des positiv geladenen Peptidanteils des Polymyxins mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Lipid-A-Komplexes der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben eine Schädigung der Zelle u. a. in Form von Vesikel- und Blasenbildung an der äußeren Membran von *P. aeruginosa* gezeigt.

Abbildung 9. Antimikrobielle Wirkung von Polymyxin



modifiziert nach Yu und Mitarbeiter 2015 [36]

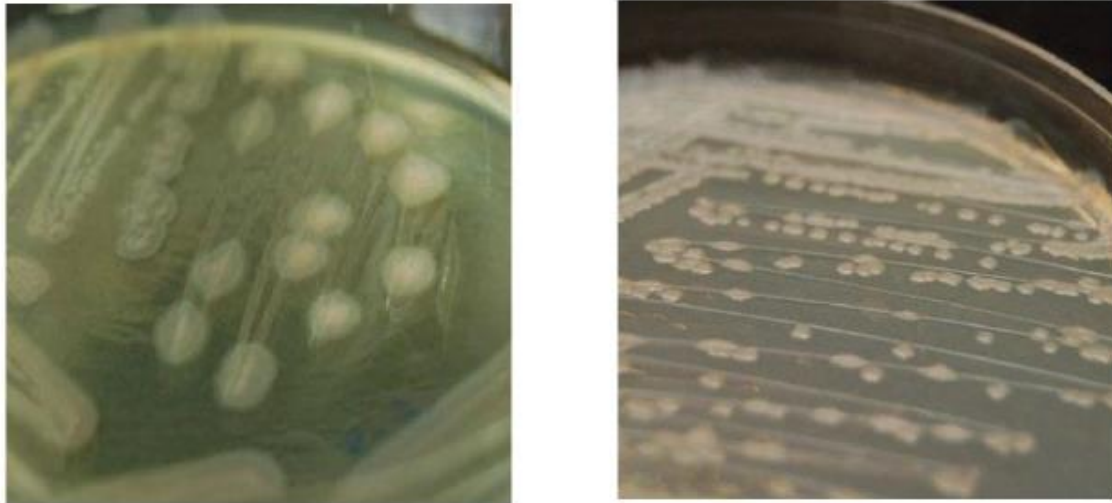
1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Erreger

Pseudomonas aeruginosa (PA) gehört zur Gattung *Pseudomonas* und zur Familie der Pseudomonadaceae. Das Bakterium ist ein nicht fermentierendes, bewegliches, gramnegatives Stäbchenbakterium mit großem Genom und zahlreichen Regulationsgenen. Es kommt ubiquitär, überwiegend im Erdboden und in Nasszellen vor und wächst bevorzugt unter aeroben Bedingungen, in Ausnahmesituationen aber auch in anaerobem Milieu. PA kann charakteristische Farbpigmente wie Pyocyanin (blaugrün), Pyoverdin (grüngelb), Pyorubin (rötlich) und Pyomelanin (bräunlich) bilden (Abbildung 10). Darüber hinaus ist PA metabolisch vielseitig und kann sich gut an verschiedenste Umweltbedingungen

anpassen. PA gilt als opportunistischer Krankheitserreger, der erst dann Infektionen verursacht, wenn die normalen Abwehrmechanismen beeinträchtigt sind.

Abbildung 10. Kulturelles Wachstum von *P. aeruginosa* mit und ohne Farbpigmente



Quelle: ASM Microbe Library

Zu den Virulenzfaktoren von PA gehören Adhäsine, Geißeln, Fimbrien, Pili, Lipopolysaccharide (LPS), Alginate und verschiedene Protein-Sekretionssysteme. Geißeln, Fimbrien und Typ-IV-Pili sind für die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle notwendig und somit essentiell für die Etablierung einer Infektion [37]. Nach der Adhäsion der Bakterien folgen Invasion und Ausbreitung der Infektion. Für jede Phase sind bestimmte Virulenzfaktoren notwendig. LPS sind Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, Alginate ist ein Exopolysaccharid, das Schutz vor Phagozytose bietet und die Biofilmbildung auf Oberflächen (z.B. in Kathetern) fördert. Mukoide PA-Varianten, die sich während der chronischen Infektion der Lunge entwickeln, zeigen eine Überexpression von Genen für die Alginatsynthese [38].

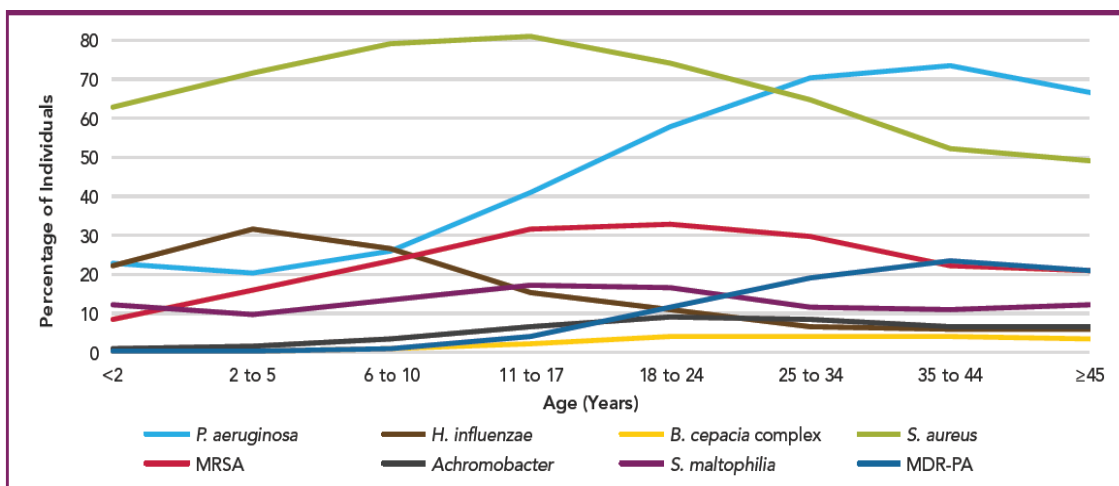
1.2.2 Pathogenese

Bei Patienten mit CF ist *Pseudomonas aeruginosa* (PA) neben *S. aureus* der häufigste und für Verlauf und Prognose der wichtigste Keim. Seine Bedeutung für die Verschlechterung der Lungenfunktion gilt als gesichert.

Man nimmt an, dass die initiale Besiedlung durch die Aufnahme des Erregers aus der Umgebung erfolgt. Jedoch ist auch eine Übertragung zwischen Patienten untereinander sowie über kontaminierte Gegenstände möglich. Eine Rekolonisierung mit PA findet auch nach einer erfolgreichen Keimeradikation statt, entweder exogen durch einen neuen Stamm aus der Umgebung oder, wie in 25% der Fälle, endogen durch gleiche Genotypen, die meist aus körpereigenen Reservoirs wie z. B. dem paranasalen Sinus stammen.

Nach neueren Erkenntnissen erfolgt die Besiedlung mit PA früher als bisher angenommen (Abbildung 11). Früher ging man davon aus, dass PA erst spät im Krankheitsverlauf auftritt, wenn sich durch vorausgegangene Infektionen mit *S. aureus* bereits Bronchiektasen gebildet haben. Neuere Untersuchungen [11, 39] konnten aber zeigen, dass das Durchschnittsalter der kulturellen Erstmanifestation bei 21 bis 23 Monaten, das der serologischen Manifestation schon ein Jahr früher bei etwa 15 Monaten liegt. Im Erwachsenenalter sind dann mehr als die Hälfte aller Patienten mit CF mit PA kolonisiert bzw. infiziert (Abbildung 11).

Abbildung 11. Erregerspektrum bei Patienten mit CF in Abhängigkeit vom Lebensalter



Quelle: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2015

Die Patienten mit CF sind nur mit einem Genotyp (sehr selten mit mehreren Genotypen) besiedelt, der sich im weiteren Verlauf der Mukoviszidose im sich ständig wechselndem Habitat der Lunge in verschiedenste Morphotypen verwandelt. Die Stämme der Frühphase sind normalerweise glatt, nicht-mukoid,

sensitiv gegenüber PA-wirksamen Antibiotika; sie unterscheiden sich nicht von denen anderer gesunder Patienten ohne CF. Mit zunehmender Besiedlungsdauer verwandeln sich die Stämme zu atypischen Morphotypen: mukoide Stämme mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung, small colony variants (SCVs) und Hypermutatoren.

Mukoide Stämme sind unbeweglich und verlieren die Fähigkeit zur Pigmentbildung. Sie bilden infolge einer Überproduktion des Kapselpolysaccharids Alginate Biofilme, in denen die Keime vor äußeren Einflüssen geschützt sind und in der chronisch infizierten Lunge persistieren können.

Bei einem Drittel der Patienten mit CF findet man Mutatorstämme, die einen Defekt im DNA-Reparatursystem haben [40] und eine erhöhte spontane Mutationsrate aufweisen. [41, 42]. Die Mutationen können zum Absterben der Erreger führen oder einen Überlebensvorteil darstellen. In einer Longitudinalstudie stieg innerhalb von 20 Jahren die Bildung der Mutatorstämme von 0% auf 65% an [43]. Mutatorstämme sind multiresistent. Von den Resistenzen sind fast alle Antibiotikaklassen betroffen. [41, 43].

Neben mukoiden PA-Stämmen wurden small colony variants (SCVs) aus dem Respirationstrakt von Patienten mit CF isoliert [17]. Die SCVs sind sehr klein (1-3 µm im Durchmesser), zeigen langsames Wachstum und weisen eine erhöhte Fähigkeit zur Biofilmbildung auf. Darüber hinaus zeigen sie eine starke Adhärenz an Oberflächen, Autoaggregation sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika. Die SCVs sind besonders mit schlechten Lungenfunktionsparametern assoziiert.

1.2.3 Pathomechanismen

1.2.3.1 Phänotypische Anpassung

Nach Aufnahme von *P. aeruginosa* (PA) aus der Umgebung, kommt es im Rahmen seiner Überlebensstrategie zu einer Anpassung an die neuen "Umweltbedingungen" in der Lunge der Patienten mit CF, vornehmlich an den ständigen Stress in der Lunge.

Auslösende Stressfaktoren sind u. a. ROS (reactive oxygen species) und RNI (reactive nitrogen intermediates). Diese werden in den Atemwegen der Patienten

mit CF durch polymorphkernige Leukozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzt. Sie erzeugen dort Stress durch freie Sauerstoffradikale und Nitritbildung. Problematisch für Patienten mit CF ist, dass sie aufgrund der verringerten Antioxidantienaufnahme aus dem Darm und der geringeren Konzentration an Gluthation, welches intrazellulär als Antioxidans wirkt, schlechter gegen oxidativen Stress geschützt sind. Die erhöhte ROS(RNI)-Konzentration, gepaart mit dem verringerten antioxidativen Schutz, führt zu einer Schädigung der Bakterien (DNA, Lipide, Proteine) [44]. Zusätzlich entsteht durch die erhöhte Aktivität der polymorphkernigen Leukozyten und deren Sauerstoffverbrauch ein mikroaerophiles (sauerstoffarmes) Milieu, an das sich die Bakterien anpassen müssen. Sie exprimieren daher in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration mit Hilfe sog. Sigma-Faktoren Gene, um unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen wachsen zu können. Ein bedeutender Sigma-Faktor bei PA ist AlgU (auch AlgT genannt), der für die Alginatbildung mitverantwortlich ist. Die Sigma-Faktoren werden durch Transmembranproteine, welche als Anti-Sigma-Faktoren (MucA, MucB, MucC) bezeichnet werden, inhibiert. Sobald der Inhibitor durch einen Stimulus wie Stress gereizt wird, setzt er den Sigma-Faktor (AlgU) frei (siehe Abbildung 12). Dieser bindet an die RNA-Polymerase, welche dann wiederum bestimmte Gene zur Stressbewältigung transkribiert [45]. Die Folge ist eine Herabregulation z. B. von Genen, welche die Beweglichkeit, Virulenz und den Metabolismus betreffen, sowie eine Hochregulation z. B. von Genen, welche die Membranpermeabilität und den Efflux beeinflussen. Letztendlich führt das zur Selektion von Mutanten, die unter den veränderten Bedingungen gut überleben können.

1.2.3.2 Alginatbildung

Reguliert wird die Alginatproduktion durch das AlgU-*mucABC*-Gencluster. AlgU ist, wie oben beschrieben, ein Sigma-Faktor, der unter Stress freigesetzt wird. Dieser bindet an die im Zytoplasma liegende RNA-Polymerase und sorgt für eine Expression von Genen und somit Enzymen, die für die Alginatsynthese benötigt werden. MucA ist der Anti-Sigmafaktor von AlgU und, an AlgU gebunden, in der

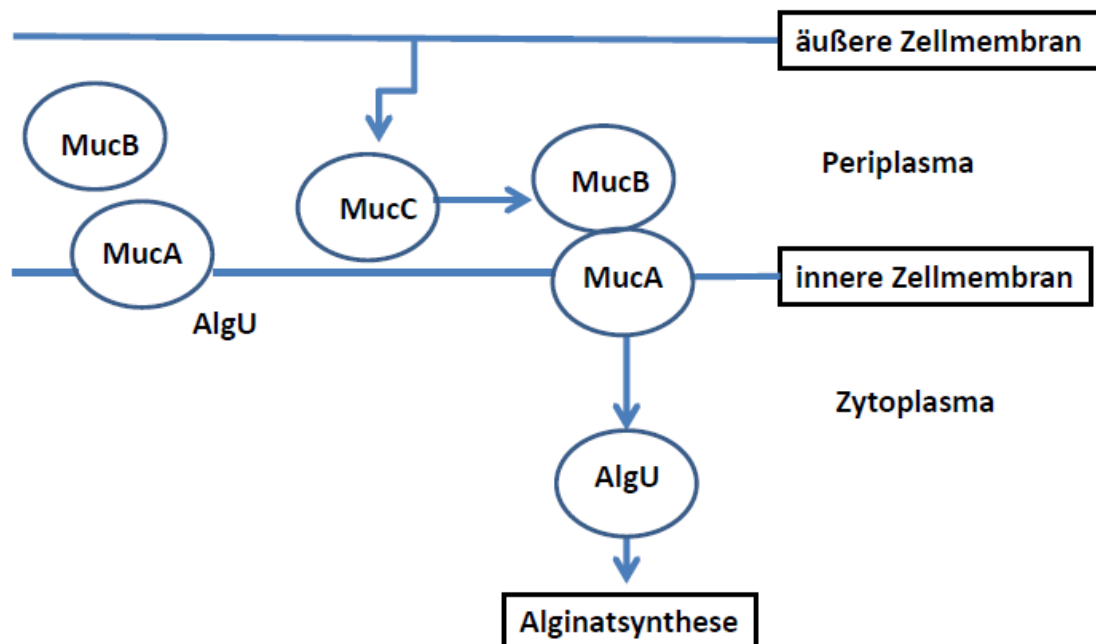
Zellmembran verankert. MucB und MucC sind weitere Anti-Sigmafaktoren, die AlgU hemmen. Sie liegen im periplasmatischen Raum.

Erhält PA über MucC ein Stresssignal, so überträgt MucB das Signal auf MucA. MucA gibt dann den Sigmafaktor AlgU frei; das führt zur Transkription von Genen und zur Expression von Enzymen, die für die Produktion von Alginat notwendig sind.

Abbildung 12. AlgU-mucABC-Gencluster

AlgU-mucABC-Gencluster

Extrazelluläres Milieu



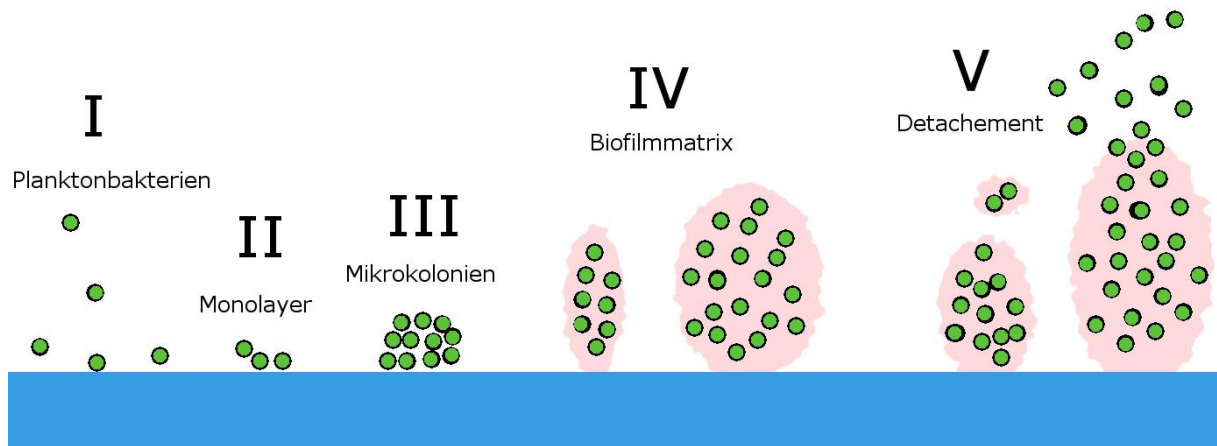
modifiziert nach Govan und Mitarbeiter 1996 [46]

Häufig findet sich im MucA eine Mutation. Folge ist, dass AlgU weniger stark gehemmt wird und es somit zu einer Überproduktion von Alginat und damit zu einem Wechsel vom nicht-mukoiden zum mukoiden Phänotyp kommt [46]. Die Überproduktion von Alginat begünstigt die Entstehung von Biofilmen und fördert die Persistenz von PA in der Lunge von Patienten mit CF. Es konnte gezeigt werden, dass mukoide und nicht-mukoide Phänotypen gleichzeitig im Sputum vom Patienten mit CF vorkommen. Nicht-mukoide Stämme können wieder durch Reversion der *mucA*-Mutation aus mukoiden Varianten entstehen.

1.2.3.3 Biofilmbildung

Ein bedeutender Pathogenitätsfaktor von *P. aeruginosa* (PA) ist die Biofilmbildung. Biofilme stellen hochorganisierte Verbände von Bakterien dar, die in eine extrazelluläre Matrix (Glykokalix) eingebettet sind.

Abbildung 13. Biofilmbildung bei *Pseudomonas aeruginosa*



modifiziert nach Wagner und Mitarbeiter 2008 [47]

Die Entstehung von Biofilmen dauert bei PA ca. 5 - 7 Tage; man unterscheidet fünf verschiedene Phasen. Phase I beginnt mit der Anheftung von planktonischen Bakterien (Einzelzellen) z. B. an Lungenepithel mit Hilfe von Flagellen oder Fimbrien oder durch Aggregation der Bakterien untereinander (Abbildung 13) [48]. Sie ist zunächst reversibel und geht dann irreversibel in eine Monolayer-Form über (Phase II). Durch Vermehrung der sessilen Bakterien (Bakterienaggregation) entstehen Mikrokolonien (Phase III) [49]. Bei Wachstum und Vermehrung der Bakterien werden Proteine, Lipide, DNA und Polysaccharide ausgeschieden und zur Stabilisation in den Biofilm eingelagert. Die sessilen Bakterien vermehren sich langsam und entwickeln sich in Abhängigkeit von den Nährstoffen zu flachen, nicht-mukoiden oder pilzartigen mukoiden Strukturen weiter (Phase IV). Diese Biofilmmatrix schließt große bakterielle Verbände ein, von denen sich gelegentlich einzelne Bakterien oder größere Aggregate lösen (Detachment) und einen neuen Bereich besiedeln können (Phase V) [47, 50].

Biofilme schützen vor Austrocknung und freien Radikalen. Sie hemmen Komplementaktivierung und Entzündungsreaktion und verhindern die Aufnahme der Bakterien durch Neutrophile und Makrophagen. Sie können daher nicht vom Immunsystem eliminiert werden, obwohl eine ausgeprägte Immunantwort gegen die Bakterien erfolgt. Man nimmt an, dass diese inflammatorische Reaktion mitverantwortlich für die pathologischen Veränderungen in der Lunge ist und mit einer Verschlechterung der pulmonalen Situation einhergeht [11]. Vermutlich wird mit der Konversion vom nicht-mukoiden zum mukoiden Typ die chronische Infektionsphase für Patienten mit CF eingeläutet. Es kommt zu einer langsam fortschreitenden Verschlechterung der Lungenfunktion [11].

Die Bakterien im Biofilm haben die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika wie planktonisch wachsende Stämme, ein Biofilm im Ganzen ist jedoch weniger sensibel [51]. Für einige Antibiotikaklassen, z. B. Fluorchinolone, stellt Alginate keine Barriere dar; sie können die Matrix des Biofilms in ausreichender Konzentration durchdringen. Andere Antibiotikaklassen wie Betalaktame können die Matrix schlecht passieren. Auch Aminoglykoside sind weniger wirksam, da sie durch die im Biofilm vorkommenden Calciumionen gehemmt werden (Chelatbildung) [52] und darüber hinaus ihre Wirksamkeit im mikroaerophilen oder anaeroben Milieu im Innern des Biofilms eingeschränkt ist [53]. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) sind für Antibiotika gegen Biofilmbildner 100- bis 1.000-fach höher als für planktonische Bakterien.

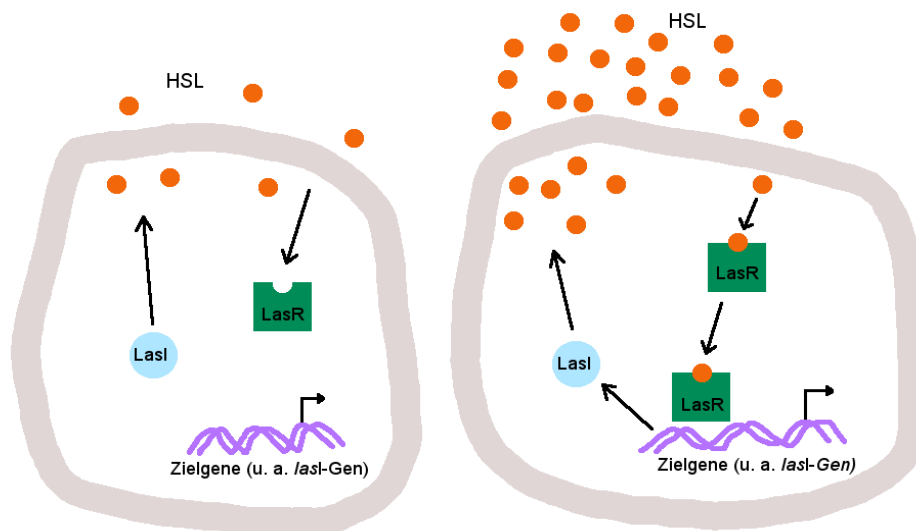
1.2.3.4 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) ist ein Kommunikationsprozess von Bakterien, einschließlich PA, der bei hoher Zelldichte mit Hilfe von Signalmolekülen von Zelle zu Zelle erfolgt. Mit Hilfe dieser Signalmoleküle können Bakterien untereinander kommunizieren und koordiniert agieren.

P. aeruginosa (PA) reguliert die Expression seiner Gene und die Produktion und/oder Sekretion vieler Virulenzfaktoren zelldichteabhängig vorwiegend mit zwei QS-Systemen, dem Las-System und dem Rhl-System, wobei das Rhl-System dem Las-System untergeordnet ist. Als Signalmoleküle fungieren N-Acyl-

Homoserin-Lactone (HSL), die mit Hilfe einer Synthetase, LasI oder RhII, produziert werden (Abbildung 14).

Abbildung 14. Quorum sensing von *Pseudomonas aeruginosa* (Las-System)



Links: geringe Zelldichte; rechts: hohe Zelldichte; modifiziert nach Waters und Bassler 2005 [54]

HSL kann die Zellmembran frei durchwandern, so dass bei hoher Keimzahl von PA die Konzentration von HSL extra- und intrazellulär ansteigt.

Bei Bakterienpopulationen mit niedrigen Wachstumsdichten erzeugt PA mit Hilfe von LasI- oder RhII-Synthetasen wenig HSL. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von HSL ist demnach niedrig, sodass HSL nicht an den Transkriptions-Regulator LasR bzw. RhIR bindet und kaum Virulenzfaktoren gebildet werden. Bei hoher Wachstumsdichte ist die Schwellenkonzentration von HSL erreicht. Die HSL-Konzentration ist so hoch, dass eine Bindung von HSL an den Transkriptionsregulator LasR bzw. RhIR erfolgen kann. Der HSL-LasR-Komplex bzw. HSL-RhIR-Komplex aktiviert nun zahlreiche Targetgene, darunter auch das *lasI*- bzw. *rhlI*-Gen. Das führt zur Produktion zahlreicher Virulenzfaktoren mit dem Ziel, die Abwehrmechanismen des Wirts zu bekämpfen, so dass sich die Bakterienpopulation weiter ausbreiten kann (Abbildung 14).

Transkriptom-Analysen konnten zeigen, dass die Gene zu verschiedenen Zeiten im QS-System exprimiert werden; das führt zu einer zeitlich geordneten Folge der Gen-Expression und ist für die Aufrechterhaltung der chronischen PA-Infektion notwendig [55].

1.2.3.5 Resistenzentwicklung

Ein weiterer Schutzmechanismus der Pseudomonaden sind die natürliche oder primäre Resistenz und die sekundäre Resistenzentwicklung.

Eine Reihe von Antibiotika ist gegen *P. aeruginosa* (PA) primär resistent (unwirksam), z. B. Ampicillin, Cephalosporine der 1. und 2. Generation, Tetrazykline u. a. Nach den Angaben in der Literatur beruht dies auf drei Eigenschaften: a) der Bildung einer chromosomal-kodierten, induzierbaren AmpC- β -Laktamase [56], b) einem ausgeprägten MexAB-OprM-Effluxsystem und c) einer verminderten Permeabilität der äußeren Zellmembran, der aber eine untergeordnete Bedeutung zukommt [56].

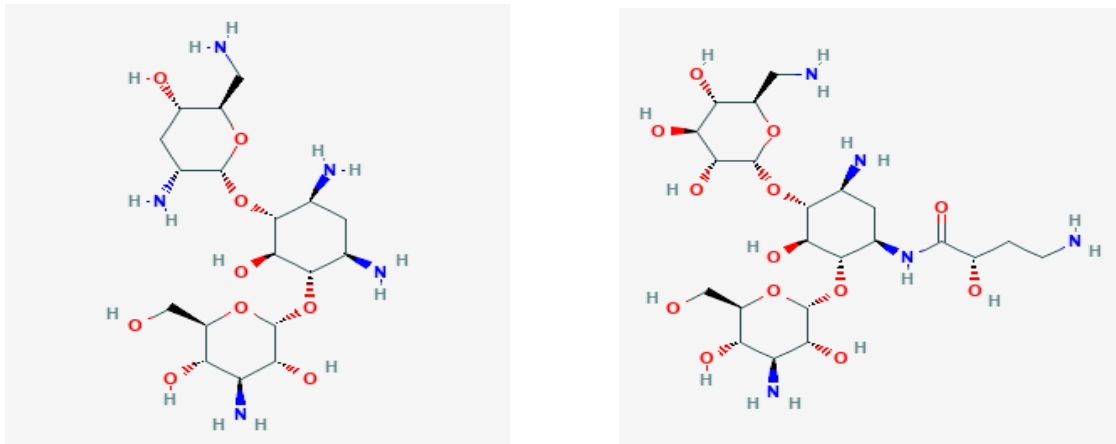
Ein primär nicht resistentes Antibiotikum verliert unter Therapie, z. B. durch Mutation oder Übertragung von Resistenzgenen, seine Wirksamkeit und wird resistent. Bei dem erworbenen oder sekundären Resistenzspektrum spiegelt sich die individuelle Behandlungsgeschichte der CF-Patienten wieder.

1.2.3.5.1 Resistenz gegen Tobramycin

Es gibt mehrere Resistenzmechanismen von PA gegen Aminoglykoside, die bei Patienten mit CF vorkommen können: i) herabgesetzte Permeabilität mit Hemmung der Aminoglykosid-Aufnahme in die Zelle (Impermeabilität), ii) Veränderung der LPS, so dass die Aminoglykoside nicht am Target reagieren können, iii) Hyperexpression von Effluxpumpen mit starkem Efflux der Aminoglykoside aus der Zelle mit Hilfe des MexAB-OprM-Effluxsystems [56] (betrifft fast alle Aminoglykoside und ist häufig mit einer Fluorchinolon- und Tetrazyklinresistenz vergesellschaftet), iv) Targetveränderungen am Ribosom durch Mutation an den ribosomalen Proteinen durch RNA-Methylasen (sehr selten, verbunden mit einer high level resistance mit MHK-Werten von ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) [57, 58], v) Aminoglykosid-modifizierende-Enzyme, welche die

Aminoglykoside so verändern, dass sie nicht an die LPS (Target) binden können. Es sind PA-Stämme beschrieben, bei denen in einem Stamm mehrere der genannten Resistenzmechanismen vorkommen können.

Abbildung 15. Strukturformeln von Tobramycin (links) und Amikacin (rechts)



Quelle: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=36294 (Tobramycin); CID=37768 (Amikacin); 2017

Zu den Hauptresistenzmechanismen von PA zählen bei Patienten, die nicht an CF erkrankt sind, die Veränderung der LPS durch die Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme von PA. Bei Patienten mit CF ist dagegen dieser Resistenzmechanismus nicht so stark ausgeprägt. Die Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme können einzelne oder mehrere NH_2 - oder OH -Gruppen des Aminoglykosidgrundgerüsts, z. B. durch Veresterung oder Phosphorylierung, verändern (Abbildung 15). Man unterscheidet 3 Aminoglykosid-modifizierende Enzymarten: Nukleotidyltransferasen (ANTs), die an die Hydroxylgruppen (OH -Gruppen) der Aminoglykoside binden, Phosphotransferasen (APHs), die ebenfalls mit den OH -Gruppen der Aminoglykoside reagieren und Acetyltransferasen (AACs), welche die NH_2 -Gruppen der Aminoglykoside verändern. Die chemisch veränderten Aminoglykoside haben eine herabgesetzte Bindungsfähigkeit an die Aminoacyl-t-RNA-Akzeptorseite der 16S rRNA der Ribosomen, so dass die Missproteinbildung weniger ausgeprägt ist oder ganz unterbleibt. Die Gene, die zur Enzymveränderung und damit zur Aminoglykosid-Resistenz führen, können plasmid- oder chromosomalkodiert sein, weiterhin

assoziiert mit transposablen Elementen, die eine rasche Ausbreitung ermöglichen, nicht nur speziesspezifisch, sondern auch zwischen verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterienarten.

In einer Studie von MacLeod und Mitarbeitern [59] wurden die Resistenzmechanismen von PA gegen Tobramycin bei 464 Patienten mit CF untersucht (Tobramycin- und Placebogruppe). Die Sputa der Studienpatienten wurden vor und am Ende einer 6 Monate dauernden Tobramycin-Inhalationstherapie (3 Zyklen einer on-off-Therapie) untersucht, die der Placebogruppe zu Beginn und am Ende der Studie. Von 928 PA-Isolaten aus beiden Gruppen wiesen 143 (15,4%) eine Tobramycin-Resistenz (MHK-Werte $\geq 16 \mu\text{g/mL}$) auf. Bei 89,5% der Tobramycin-resistenten Stämme war der Resistenzmechanismus Impermeabilität, bei 5,6% waren Aminoglykosid-modifizierende Enzyme die Ursache, und bei 4,2% lag eine Kombination von Impermeabilität und Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen vor. Während die MHK-Werte der durch Impermeabilität verursachten resistenten Stämme im Wesentlichen eine low level resistance (LLR) mit MHK-Werten von $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ gegen Tobramycin aufwiesen, waren bei den Enzym-vermittelten Resistenzen auch Stämme mit einer high level resistance (HLR) mit MHK-Werten von $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ zu beobachten.

In einer Tobramycin-Inhalationsstudie von Shawar und Mitarbeitern [60] wurden 1.240 PA-Isolate von 508 Patienten mit CF ausgetestet. Die Resistenz von PA gegen Tobramycin lag bei 5,4%, nicht-mukoide Stämme waren resistenter als mukoide. Von 56 resistenten Stämmen wurde der Resistenzmechanismus bestimmt. Bei 87,5% konnte eine Impermeabilität nachgewiesen werden (MHK-Werte von 16 bis $> 512 \mu\text{g/mL}$), bei 3,6% lag eine Kombination aus Impermeabilität und enzymvermittelter Resistenz vor.

Ein weiterer Resistenzmechanismus scheint auch die Fähigkeit mancher PA-Stämme zu sein, bei subinhibitorischen Tobramycin-Konzentrationen eine Biofilmbildung zu induzieren [61, 62, 63].

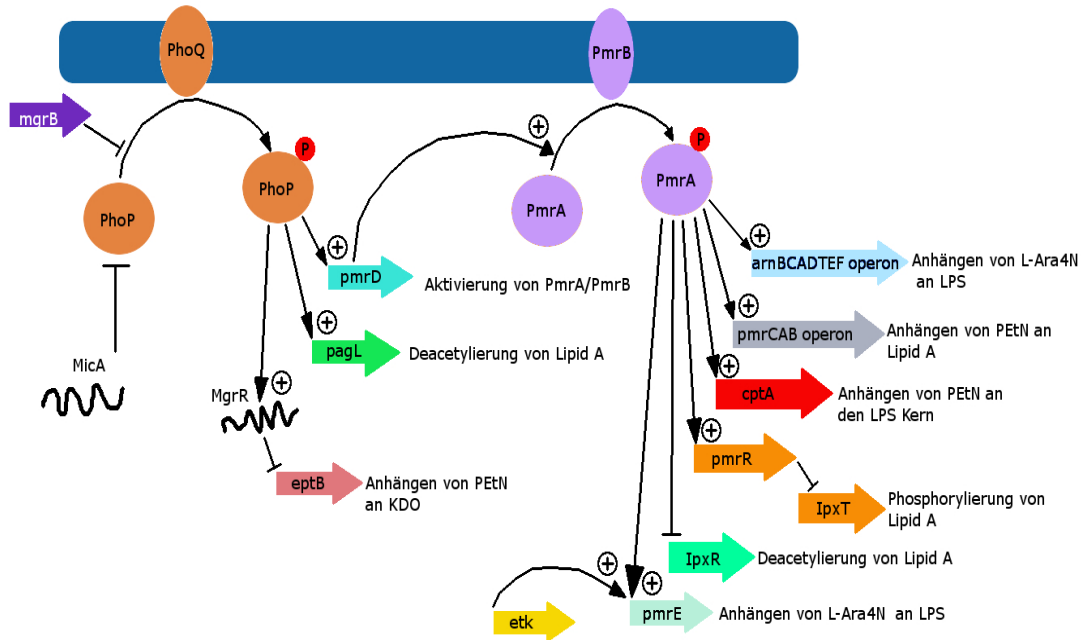
Kreuzresistenzen zwischen den Aminoglykosiden sind zu erwarten bei eingeschränkter Permeabilität, Efflux, Veränderung der LPS und Methylierung des Ribosoms. Bei Resistenzentwicklung durch Aminoglykosid-modifizierende

Enzyme beschränkt sich die Resistenz auf die Substanz, deren OH- oder NH₂-Gruppen verändert worden sind. Da sich der Angriff auf die NH₂-Gruppen von Amikacin von dem auf Tobramycin unterscheidet, können z. B. Gentamicin und Tobramycin unwirksam und kann Amikacin wirksam sein [56]. Ein Stamm kann auch mehr als ein Gen für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme haben.

1.2.3.5.2 Resistenz gegen Colistin

Da LPS eine stabile Struktur hat und Colistin seine Aufnahme in die Zelle selbst ohne aktiven Transport fördert und zu einer irreversiblen Schädigung der Zytoplasmamembran von PA führt, kommt es selten zur Resistenzentwicklung, auch unter Therapie [64]. Ein häufiger Resistenzmechanismus ist eine Modifikation der negativ geladenen Lipid-A-Phosphate der äußeren Zellwand durch positiv geladene Gruppen. Durch die Veränderung bzw. Abschwächung der negativen Ladung der Bakterienzelle kann die elektrostatische Anziehung des Polymyxins herabgesetzt oder vermieden werden [65]. Eine sehr häufige Modifikation der Lipid-A-Phosphate, aber nicht die einzige, ist z. B. die Anlagerung von Aminoarabinose [66]. Diese wird reguliert durch das Operon *arnBCADTEF*, das durch die Zweikomponentenregulationssysteme, PhoP-PhoQ-System und PmrA-PmrB-System, bei niedriger Mg²⁺-Konzentration und/oder geringer Colistinkonzentration induziert wird. Die Sensorkinase PhoQ, die auf die geringe Mg²⁺-Konzentration reagiert, phosphoryliert zunächst das Regulationsprotein PhoP, welches dann das *prmD*-Gen anregt, das entsprechende PmrD-Protein zu exprimieren. Mit Hilfe des PmrD-Proteins wird in der Gegenwart von Fe³⁺ das PrmA-PrmB-System aktiviert. Die Sensorkinase PrmA wird zum Regulationsprotein PrmA-P phosphoryliert, welches dann das Operon *arnBCADTEF* induziert, Enzyme zu kodieren, die zur Veränderung von Lipid A notwendig sind (Abbildung 16). Darüber hinaus kann das Regulationssystem PrmA-PrmB auch unabhängig vom PhoP-PhoQ-System reagieren und über eine Induktion des Operons *arnBCADTEF* zu einer Anlagerung von Aminoarabinose führen (Abbildung 16).

Abbildung 16. Resistenzmechanismen gegen Colistin



modifiziert nach Olaitan und Mitarbeiter 2014 [65]

Für die Resistenzentwicklung spielen weiterhin das MexAB-OprM Efflux-System sowie die Expression von „Outer Membrane Protein H“ (OprH) eine Rolle. OprH ist ein Membranstabilisierungsprotein, welches bei Anwesenheit von PA eine Polymyxin-Resistenz promoten kann [67]. Diese Resistenzmechanismen sind chromosomal kodiert, so dass keine horizontale Übertragung der Resistenz stattfindet.

2. Fragestellung

Bei Patienten mit CF ist *P. aeruginosa* (PA) der häufigste und für Verlauf und Prognose der wichtigste Keim. Seine Bedeutung für die Verschlechterung der Lungenfunktion gilt als gesichert.

Nach neueren Erkenntnissen erfolgt die Besiedlung mit PA schon im ersten Lebensjahr. Da sich Pseudomonaden sehr gut an die Bedingungen und den ständigen Stress in der CF-Lunge anpassen können, bleiben die Patienten lebenslang mit PA besiedelt oder infiziert. Mit zunehmender Besiedlungsdauer verändern sich die PA-Stämme im Rahmen ihrer Überlebensstrategie zu atypischen Morphotypen, z. B. zu mukoiden Stämmen mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung. Vermutlich wird mit der Konversion vom nicht-mukoiden zum mukoiden Typ die chronische Infektionsphase für Patienten mit CF eingeläutet. Es kommt zu einer langsam fortschreitenden Verschlechterung der Lungenfunktion.

Als Gegenmaßnahme versucht man, durch eine frühzeitige, aggressive Eradikationstherapie mit Antibiotika die planktonischen Stämme abzutöten und die Biofilmbildung zu verhindern oder hinauszuzögern. Wenn dies nicht gelingt, versucht man bei chronischer Besiedlung durch eine lebenslange antibiotische Suppressionstherapie die hohe Keimdichte zu reduzieren und die Lungenfunktion so lange wie möglich stabil zu erhalten.

Die Eradikationstherapie besteht aus einer 2-wöchigen systemischen Antibiotikatherapie, gefolgt von einer kurzfristigen Inhalationstherapie mit Tobramycin oder Colistin. Die Suppressionstherapie wird lebenslang durchgeführt. Die Patienten erhalten im Abstand von 3 - 4 Monaten Zyklen einer 14-tägigen parenteralen Applikation von PA-wirksamen Antibiotika und zusätzlich im Intervall dauerhaft eine Inhalationstherapie mit Colistin oder Tobramycin. Die über einen langen Zeitraum applizierte Inhalationstherapie birgt das Risiko der Resistenzentwicklung.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob gegen die bei der Inhalationstherapie eingesetzten Antibiotika Tobramycin oder Colistin eine Resistenzentwicklung auftritt und ob sich die beiden Substanzen hinsichtlich der Resistenzentwicklung

unterscheiden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob der parenterale Einsatz von Tobramycin zur Resistenzentwicklung von PA beiträgt.

Daneben war es von Interesse, ob die Patienten mit CF im Lauf ihres Lebens mit unterschiedlichen Genotypen besiedelt oder infiziert sind. Da bei der mikrobiologischen Untersuchung unterschiedliche Phänotypen nachweisbar sind, die sich sowohl morphologisch als auch in ihrer Resistenz unterscheiden, lag der Verdacht nahe, dass es sich um verschiedene Genotypen handelt. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass ein Genotyp sich in verschiedene Phänotypen umwandeln kann.

Ein weiteres Ziel war es zu klären, ob bei Patienten mit CF, die mit phänotypisch identischen PA-Stämmen besiedelt waren, Übertragungen stattgefunden haben und ob im positiven Fall Hygienemaßnahmen ggf. verbessert werden müssten.

Zusammenfassend ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Entwickeln sich unter der Inhalationstherapie mit Tobramycin oder Colistin Resistenzen?
2. Eignet sich die retrospektive Analyse zur Feststellung der Resistenzentwicklung?
3. Unterscheiden sich die Inhalations-Substanzen Tobramycin und Colistin im Hinblick auf die Entwicklung von Resistenzen?
4. Hat insbesondere die Gabe von parenteralem Tobramycin Einfluss auf die Resistenzentwicklung?
5. Sind Patienten lebenslang mit gleichen oder unterschiedlichen PA-Genotypen (Klonen) besiedelt?
6. Kommt es im Krankheitsverlauf zur Aufnahme neuer Genotypen (Klone) oder zu einer klonalen Variation bei gleichem Genotyp?
7. Gibt es Übertragungen von PA von einem Patienten auf den anderen?

3. Patienten, Material und Untersuchungsmethoden

3.1 Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung zur Resistenzentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* (PA) gegenüber Tobramycin und Colistin bei chronisch besiedelten oder infizierten Patienten, die im Christiane Herzog - Zentrum für Mukoviszidose in der Kinderklinik der Universität Würzburg zwischen 1990 und 2009 im Rahmen einer Suppressionstherapie eine Inhalation mit Tobramycin oder Colistin erhalten haben. Anhand der mikrobiologischen Ergebnisse, die vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden (Archiv IHM) und der Patientenakten wurde die in Routineuntersuchungen bestimmte und im Befund übermittelte Sensitivität der Erstisolate von PA gegenüber Tobramycin und Colistin mit der Sensitivität aller Folgeisolate bis 2009 verglichen und die Resistenzrate berechnet. Vor Studienbeginn (2009) wurde die Richtigkeit der routinemäßigen und in den Akten der Studienpatienten dokumentierten Ergebnisse der Resistenzbestimmung von PA gegen Tobramycin und Colistin an stichprobenartig ausgesuchten kryokonservierten Stämmen (300 Isolate) mittels MHK-Bestimmung (Referenzmethode) von Dr. Valenza (IHM) überprüft.

3.2 Patienten

Die Patienten wurden aus dem Christiane Herzog - Zentrum für Mukoviszidosekranke in der Kinderklinik der Universität Würzburg akquiriert. Nach Diagnosestellung wurde für jeden Patienten ein Verlaufsbeobachtungsplan erstellt, wonach sich jeder Patient regelmäßig im Christiane Herzog - Zentrum vorstellen sollte. Leitliniengerecht waren das vier Ambulanzbesuche im Jahr, die jedoch nur von kooperationsbereiten Patienten zuverlässig erfolgten. Bei diesen Kontrollbesuchen wurde u. a. eine mikrobiologische Untersuchung auf das Vorhandensein pathogener Erreger im Respirationstrakt veranlasst. Dafür wurden Proben aus dem Respirationstrakt, üblicherweise Sputum, entnommen und im IHM mikrobiologisch, besonders auf das Vorhandensein von PA, untersucht. Die Empfindlichkeit der PA-Isolate gegenüber PA-wirksamen

Antibiotika, einschließlich Tobramycin und Colistin, wurde mit Routineverfahren bestimmt. Die Ergebnisse (Befunde) wurden an das Christiane Herzog - Zentrum in der Kinderklinik übermittelt und dort in der Krankenakte archiviert. Die parenterale Antibiotikatherapie erfolgte gezielt nach dem Antibiogramm.

Die Erfassung und Auswahl der Patienten erfolgte anhand der mikrobiologischen Ergebnisse aus den Krankenakten und aus dem Archiv des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg. Berücksichtigt wurden Patienten, die sich zwischen 1990 und 2009 im Christiane Herzog - Zentrum vorgestellt hatten und dort behandelt wurden. Chronisch mit PA besiedelte Patienten wurden in die Studie eingeschlossen und vom Zeitpunkt des PA-Erstnachweises bis 2009 oder bis zum Tod beobachtet. Neben den mikrobiologischen Ergebnissen wurden auch die Regime der parenteralen Antibiotikatherapie und der Inhalationstherapie erfasst und dokumentiert (Name, Alter, Geschlecht, klinischer Befund, isolierte Erreger, Anzahl der PA-Isolate, Ergebnisse der Resistenzbestimmung von PA gegen Tobramycin und Colistin, Häufigkeit der parenteralen Antibiotikatherapie, Auswahl der applizierten Antibiotika, Schema der Inhalationstherapie und deren Dauer sowie Auswahl der Antibiotika). Die Daten jedes Patienten wurden auf einem Formblatt protokolliert und am Studienende ausgewertet (Beispiel siehe Anhang).

3.3 Eradikationstherapie

Bei Erstdnachweis von PA wurde entsprechend dem Vorgehen in dänischen CF-Zentren bei allen Patienten eine Keimelimination mittels parenteraler 14-tägiger antibiotischer Therapie und anschließender kurzfristiger Inhalationstherapie mit Colistin oder Tobramycin versucht. Das entspricht dem Eradikationsschema nach der im Jahr 2014 veröffentlichten S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, Modul 1: Diagnostik und Therapie nach dem ersten Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*“ [25] (siehe 1.1.6.1 Eradikationstherapie). Nach 3-maliger erfolgloser Keimeradikation wurde mit einer Suppressionstherapie der Patienten begonnen (siehe Kapitel 3.4).

3.4 Suppressionstherapie

Die Suppressionstherapie wurde bei Patienten ab dem 6. Lebensjahr sofort nach Diagnosestellung der chronischen Infektion mit PA begonnen (Definition 1.1.6.2, Suppressionstherapie) und lebenslang in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung, wie im Kapitel 1.1.6. beschrieben, durchgeführt. In den ersten Jahren des Beobachtungszeitraums stand Tobramycin für die Inhalation noch nicht zur Verfügung, daher wurde bei manchen Patienten die Inhalationstherapie mit Gentamicin (3 x 80 mg) begonnen und bei Verfügbarkeit von Tobramycin mit Tobramycin weitergeführt. Im weiteren Verlauf waren zur inhalativen Therapie in Deutschland nur Tobramycin und Colistin im Handel erhältlich. Vor wenigen Jahren wurden auch Aztreonamlysin und Levofloxacin-Lösung zur Inhalation eingeführt. Letztere werden in der Studie nicht berücksichtigt.

3.5 Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische Diagnostik wurde im Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) nach Standardmethoden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt und in diese Arbeit übernommen.

Im IHM erfolgte die mikrobiologische Diagnostik entsprechend der Empfehlungen der MiQ 24 (Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik) [19]. Die MiQ 24 beschreibt das diagnostische Vorgehen bei Atemwegsinfektionen von Patienten mit Mukoviszidose und wird von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) herausgegeben.

3.5.1 Probengewinnung

Die Proben für die mikrobiologische Diagnostik wurden bei den Kontrolluntersuchungen im Christiane Herzog - Zentrum vor Beginn einer antibiotischen parenteralen oder inhalativen Therapie von dessen Personal gewonnen. Als Untersuchungsmaterialien dienten in erster Linie Sputa, seltener Trachealsekrete und in Einzelfällen Bronchialsekrete. Bei sehr jungen Patienten, die noch nicht in der Lage waren, Sputum zu expectorieren, wurden auch tiefe Rachenabstriche entnommen. Letztere erfolgten nicht durch einfache Abstriche des Oropharynx, sondern durch vorsichtiges Touchieren der Rachenhinterwand.

Dies löste häufig Husten aus, so dass das hochgehustete Material aufgenommen werden konnte. Sputum von älteren Kindern und Erwachsenen wurde durch spontane Expektoration aus den tiefen Atemwegen gewonnen (die Patienten wurden aufgefordert zu husten), in Einzelfällen wurde die Sputumproduktion mittels Inhalation hypertoner Kochsalzlösung (3 mL einer 3 - 7%igen NaCl-Lösung) induziert. Bei intubierten Patienten wurde Trachealsekret bzw. Bronchialsekret und Bronchoalveoläre Lavage (BAL) untersucht.

3.5.2 Probentransport

Die Proben wurden durch den klinikeigenen Hol- und Bringdienst ins Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) der Universität Würzburg gebracht und dort am Tag der Abnahme verarbeitet.

3.5.3 Probenverarbeitung

Im IHM wurden die Proben sofort nach Eintreffen im Labor von den Mitarbeitern des Instituts nach den Empfehlungen der MiQ 24 [19] verarbeitet und mit Hilfe der in Tabelle 2 angegebenen Geräte und Materialien analysiert.

Tabelle 2. Geräte und Materialien

Analysengeräte	Firma
Vitek 2 Identifizierung von <i>P. aeruginosa</i> Empfindlichkeitsprüfung von <i>P. aeruginosa</i>	bioMérieux, Nürtingen
Nährmedien	
Columbia-Agar mit Schafblut (Blutagar) Optimalmedium	bioMérieux, Nürtingen
Kochblutagar mit Bacitracin Selektivagar für <i>H. influenzae</i>	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
MacConkey-Agar Selektivagar für Enterobacterales	Eigenherstellung Nährbodenküche (IHM)
Cetrimid-Agar; Selektivagar für <i>P. aeruginosa</i>	Eigenherstellung Nährbodenküche (IHM)
<i>Burkholderia</i> -Agar Selektivagar für <i>B.-cepacia</i> -Komplex	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Identifikationssysteme	
API 20 NE Identifizierung von Nonfermentern	bioMérieux, Nürtingen
Vitek 2 ID card Identifizierung von Nonfermentern	bioMérieux, Nürtingen

Empfindlichkeitsprüfung	
Vitek AST card zur Resistenzbestimmung von gramnegativen Stäbchenbakterien und von <i>P. aeruginosa</i>	bioMérieux, Nürtingen
Testblättchen: Tobramycin 10µg	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Mueller-Hinton-Agar für den Agardiffusionstest	Eigenherstellung Nährbodenküche (IHM)
Mueller-Hinton-Bouillon für MHK-Bestimmung	Eigenherstellung Nährbodenküche (IHM)
Etest®- Streifen: Tobramycin 0,016 - 256 µg/mL Colistin 0,016 - 256 µg/mL	AB BIODISK, Solna, Schweden
Mikrotiterplatten zur MHK-Bestimmung: Tobramycin 0,016 - 256 µg/mL Colistin 0,016 - 256 µg/mL	Becton Dickinson, Heidelberg
Referenzstamm	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

3.5.4 Kulturelle Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa*

Zur kulturellen Anzucht von *P. aeruginosa* (PA) wurden nach Arbeitsanweisung des IHM die Nährmedien, wie in Tabelle 3 beschrieben, inkubiert.

Tabelle 3. Kulturmedien zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* (nach MiQ 24) [19]

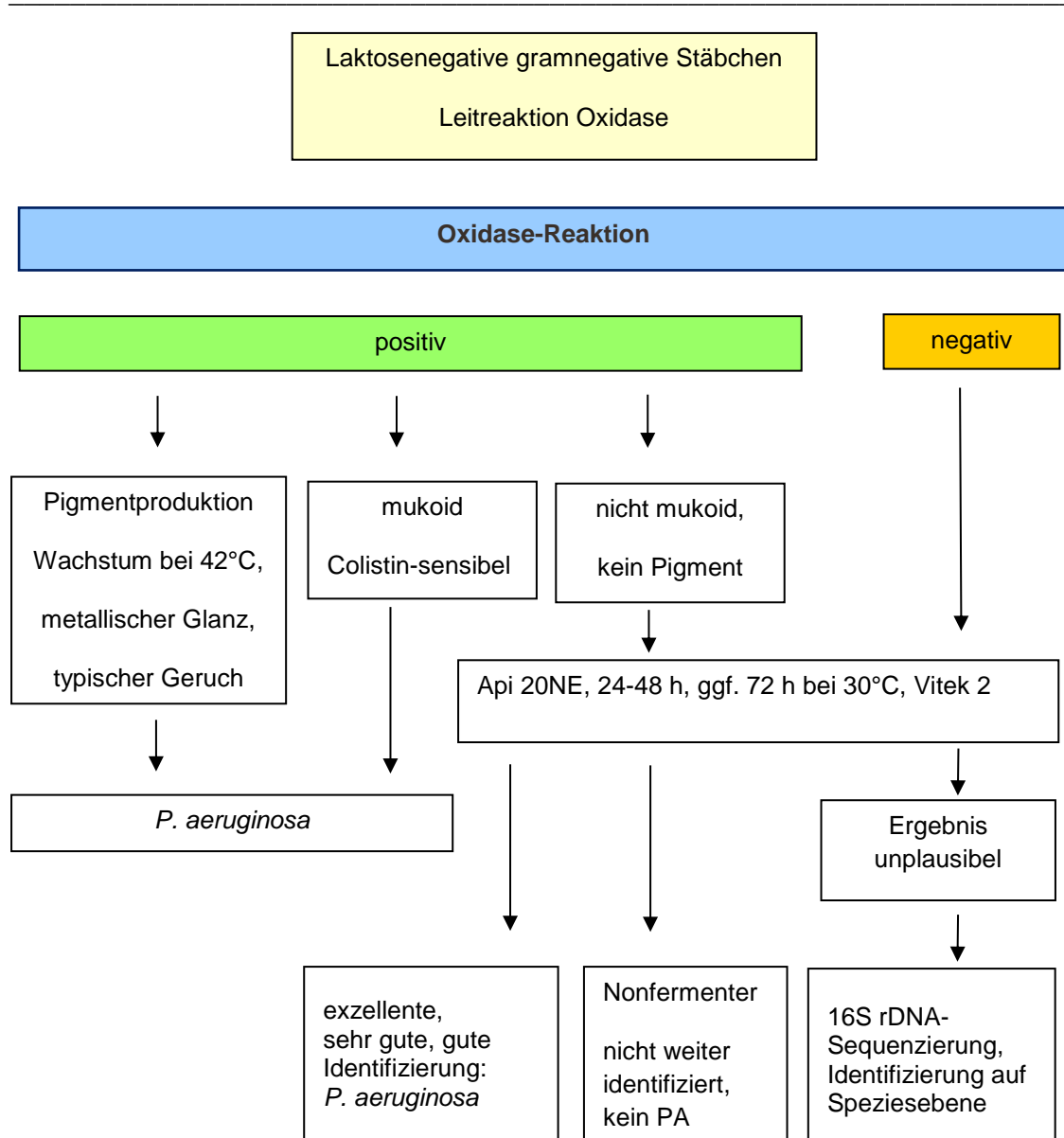
Nährmedium	Sputum	TS/BAL	Rachenabstrich	Inkubation
Blutagar, Kochblutagar mit Bacitracin	X	X	X	48 h bei 36 ± 1°C in CO ₂
MacConkey-Agar	X	X	X	48 h bei 36 ± 1°C
Cetrimid-Agar	X	X	X	72 h bei 42°C
<i>Burkholderia</i> -Agar	X	X	X	72 h bei 32 - 35°C, danach 48 h bei Raumtemperatur

TS: Trachealsekret; BAL: Bronchoalveoläre Lavage

Die Agarplatten wurden täglich von den Ärzten des IHM auf Wachstum von PA überprüft, abgelesen wurde quantitativ (BAL und Trachealsekret) bzw. semiquantitativ (Sputa, Rachenabstriche) (wenig, mäßig viel, viel). Die Isolate wurden auf Speziesebene identifiziert, und es erfolgte eine Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Tobramycin und Colistin.

3.5.5 Erregeridentifikation

Abbildung 17. Flussdiagramm zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*



modifiziert nach MiQ 24 [19]

Die Identifikation der Isolate erfolgte durch die Mitarbeiter des IHM nach den in Abbildung 17 angegebenen Vorgaben. Alle PA-Isolate wurden bei minus 80°C eingefroren und in der Stammsammlung des IHM kryokonserviert.

3.5.6 Empfindlichkeitsprüfung von *Pseudomonas aeruginosa*

Alle Morphotypen von PA wurden einer Empfindlichkeitsprüfung gegen Tobramycin und Colistin unterzogen. Im Jahr 1990 standen dafür am IHM der Agardiffusionstest und die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Bestimmung) mittels Mikrodilution (Mikrobouillon-Dilution) oder mittels Gradientendiffusionstest (Epsilontest), kurz Etest[®] genannt, zur Verfügung. Ab dem Jahr 2005 kamen auch mechanisierte Verfahren (z. B. Breakpointmethode mittels Vitek 2) zum Einsatz. Die Breakpointmethode ist eine vereinfachte Empfindlichkeitsprüfung im Mikrodilutionsverfahren. Die Konzentrationen der Antibiotika werden so ausgewählt, dass eine Unterscheidung zwischen empfindlichen und resistenten Stämmen möglich ist. Der Empfindlichkeitsprüfung wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum das Regelwerk der NCCLS (bis Ende 2004) [68] oder das Regelwerk der CLSI (Nachfolgeregelwerk ab 2005) [69] zugrunde gelegt unter regelmäßigem Mitführen des Referenzstamms *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Qualitätskontrolle). Auch die Bewertung der abgelesenen Grenzwerte, Hemmhofgrößen des Agardiffusionstests und MHK-Werte der Mikrodilution oder des Etests[®], erfolgte nach diesen Regelwerken. EUCAST stellte erst ab 2010, also nach Studienende, Grenzwerte für Colistin zur Verfügung.

Die Empfindlichkeitsprüfung von PA wurde nicht ausschließlich mittels Vitek 2 durchgeführt, da diese Methode für die Nonfermenter der Patienten mit CF zum damaligen Zeitpunkt noch nicht ausreichend validiert war.

3.5.6.1 Agardiffusionstest

Agardiffusionstest nach dem NCCLS-/CLSI-Regelwerk [68, 69].

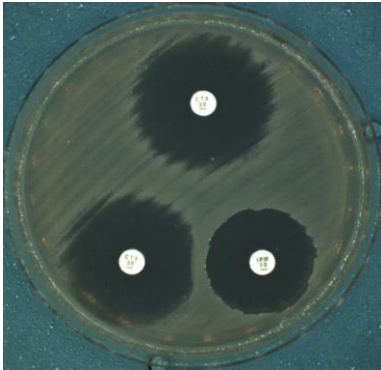
Tabelle 4.

Empfindlichkeitsprüfung von *P. aeruginosa* mit Agardiffusion nach CLSI (z. B. M100-S19; 2009)
Inokulum: 0,5 MacFarland-Standard, Inkubation 16 -18 h bei 36 ± 1°C auf Mueller-Hinton Agar

Antibiotikum	Beschickung	R	I	S
Tobramycin	10 µg	≤ 12 mm	13 - 14 mm	≥ 15 mm

S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

Abbildung 18. Agardiffusionstest von *P. aeruginosa*

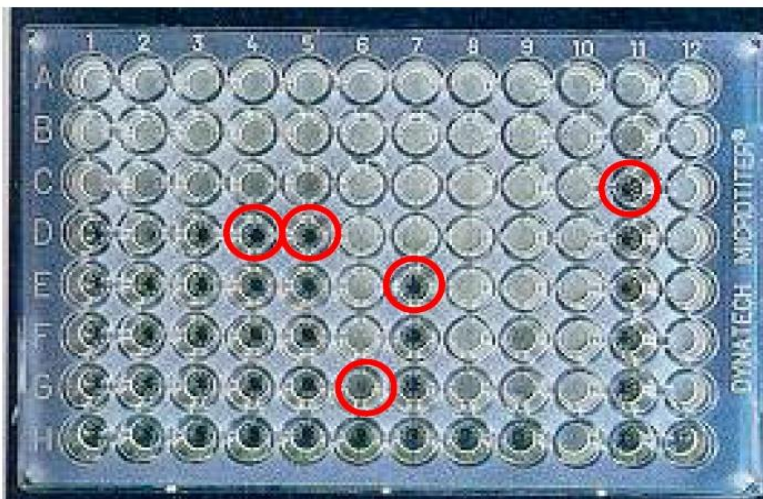


Quelle: Dr. Giuseppe Valenza

3.5.6.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrodilution

Die Mikrodilution wurde in Mikrotiterplatten der Firma Becton Dickinson unter Verwendung von Kationen-supplementierter Mueller-Hinton-Bouillon nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Als MHK wird die geringste Antibiotikakonzentration abgelesen, die ein sichtbares Bakterienwachstum vollständig hemmt (siehe Abbildung 19) (Tabelle 5).

Abbildung 19. Empfindlichkeitsprüfung mittels Mikrodilution



1-12: verschiedene Antibiotika, A-H: verschiedene Antibiotikakonzentrationen, z. B. 0,125 µg/mL (A) bis 16 µg/mL (H). Die roten Kreise entsprechen den MHK-Werten (z. B. 4 D: 1 µg/mL; 7 E: 2 µg/mL);
Quelle: Prof. Dr. Michael Kresken

Tabelle 5. Antimikrobielle Aktivität von *P. aeruginosa* gegenüber Tobramycin und Colistin mittels Mikrodilution nach CLSI (z. B. M07-A8, M100-S19; 2009)
Inokulum: 0,5 MacFarland, Inkubation 18 - 20 h bei 36 ± 1°C in Mueller-Hinton-Bouillon

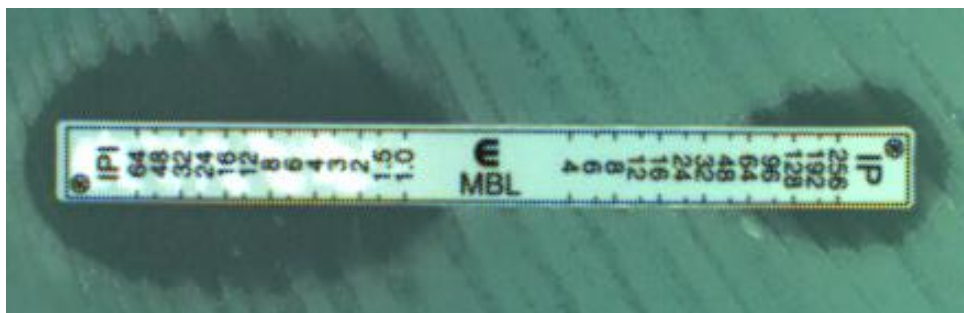
Antibiotikum	S	I	R
Colistin	≤ 2 µg/mL	4 µg/mL	≥ 8 µg/mL
Tobramycin	≤ 4 µg/mL	8 µg/mL	≥ 16 µg/mL

S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

3.5.6.3 Epsilon-Test (Etest®)

Der Etest® wurde nach den Angaben der Hersteller auf Mueller-Hinton-Agar durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 18 - 20 h wurden die MHK-Werte abgelesen und nach NCCLS/CLSI [68, 69] bewertet (Tabelle 5).

Abbildung 20. Beispiel Etest® von PA gegen Imipenem (IP) und Imipenem plus EDTA (IPI)



Die ellipsenförmigen Hemmhöfe entsprechen den MHK-Werten (IPI: <1 µg/mL, IP: 64 µg/mL); EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; Quelle: Dr. Giuseppe Valenza

Der Etest® war zu dieser Zeit ein gängiges Verfahren [70, 71] zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien. Diskrepanzen zwischen Vitek 2 und Etest® wurden mit der Mikrodilutionsmethode überprüft.

3.5.6.4 Empfindlichkeitsprüfung von Tobramycin

Im IHM erfolgte die Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Tobramycin bei Patienten mit CF von 1990 bis 2005 sowohl mit dem Agardiffusionstest als auch mit der MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution. Das Ergebnis der MHK-Bestimmung wurde dem Christiane Herzog - Zentrum übermittelt (sensibel,

intermediär sensibel, resistent). Ab 2006 wurde die Empfindlichkeitsprüfung mit dem Agardiffusionstest und mit der Breakpoint-Methode mittels Vitek 2 nach CLSI [69] durchgeführt. Diskrepanzen zwischen Agardiffusions- und Vitek-2-Ergebnissen wurden mit der MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution überprüft; die Ergebnisse der MHK-Werte wurden dann an das Christiane Herzog - Zentrum übermittelt (sensibel, intermediär sensibel, resistent).

3.5.6.5 Empfindlichkeitsprüfung von Colistin

Da die Agardiffusion von den internationalen Fachgesellschaften nur bedingt empfohlen wird [19], erfolgte die Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Colistin bei Patienten mit CF von 1990 bis 2005 ausschließlich mit der MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution, ab 2006 sowohl mit der Breakpoint-Methode mittels Vitek 2 als auch mit dem Etest[®] nach Herstellerangaben. Diskrepanzen zwischen Etest[®]- und Vitek-2-Ergebnissen oder unplausible Ergebnisse wurden mittels minimaler Hemmkonzentration (Mikrodilution mit Mikrotiterplatten der Firma Becton Dickinson) überprüft. Die Ergebnisse der Mikrodilution wurden dem Christiane Herzog - Zentrum übermittelt.

3.5.6.6 Validität der routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfung

Die Richtigkeit der in der Routinediagnostik bestimmten und an das Christiane Herzog - Zentrum übermittelten Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Tobramycin und Colistin wurde von Dr. Valenza (IHM) anhand von 300 zufällig ausgewählten PA-Isolaten mittels Etest[®] vor Studienbeginn im Jahr 2009 überprüft. Dazu wurden 300 kryokultivierte Stämme (von jedem Patienten 5 - 10 Stämme) aufgetaut und auf Blutagar kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Isolate sowohl mit dem Agardiffusionstest zur Sensitivitätsbestimmung von Tobramycin als auch mit dem Etest[®] zur Sensitivitätsbestimmung von Tobramycin und Colistin im Doppelansatz getestet. Die Bewertung der MHK-Werte bzw. der Hemmhofgrößen erfolgte nach dem Regelwerk der CLSI [69]. Die bei dieser Testung erhaltenen Ergebnisse (sensibel, intermediär sensibel, resistent) wurden mit denen in der Routinediagnostik getesteten und in den Akten dokumentierten Ergebnissen

(sensibel, intermediär sensibel, resistent) verglichen. Diskrepanzen in der Empfindlichkeit von Colistin zwischen Etest® und den Ergebnissen in den Akten wurden mittels minimaler Hemmkonzentration (Mikrodilution mit Mikrotiterplatten der Firma Becton Dickinson) überprüft.

3.5.7 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse

Die molekulargenetische Typisierung der Isolate von *P. aeruginosa* (PA) wurde mit der RAPD-Technik, wie von Mahenthiralingam und Mitarbeitern [72] beschrieben, von Dr. Valenza (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) durchgeführt. Die Daten wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Ausgewählt wurden die PA-Isolate, die schon bei Erstdiagnose resistent gegen Tobramycin waren (Patient 10, 15 und 22), ferner vier von sieben Isolaten, bei denen sich unter der Suppressionstherapie der Patienten eine Resistenz gegenüber Tobramycin entwickelte oder nachweisbar war (Patient 2, 6, 18 und 21).

3.5.8 Statistische Methoden

Der Einfluss auf die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin in verschiedenen Patientengruppen wurde statistisch ausgewertet. Dies erfolgte mit Hilfe der webbasierten App:

„Statistics - The Art and Science of learning from Data“ von Agresti, Franklin und Klingenberg (https://istats.shinyapps.io/PermDist_2samples/).

Die Gruppeneinteilung (1 bis 4) der Patienten wurde aufgrund der Tobramycin-Resistenz vorgenommen; diese ist deshalb nicht als zufällig anzusehen, so dass für diesen Parameter kein vergleichender statistischer Test durchgeführt wurde. Mit den anderen die Resistenzentwicklung beeinflussenden Parametern (Lebensalter in Jahren bei Erstdiagnose und bei Beginn der Suppressionstherapie, Dauer der Suppressionstherapie und der Tobramycin- und Colistin-inhalation in Jahren bzw. in Wochen, Gesamtzyklen der parenteralen Tobramycin- und Antibiotikatherapie) wurden Tests auf Gleichheit der Mittelwerte

durchgeführt. Der t-Test wird bei diesen Mittelwertvergleichen am häufigsten eingesetzt. Bei kleinen Fallzahlen hat er aber nur eine geringe Aussagekraft. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wurde stattdessen der Permutationstest (ein Resamplingtest) angewandt, der auch bei kleinen Patientenzahlen nutzbar ist. Für einen Parameter wurden jeweils zwei Patientengruppen verglichen und ermittelt, ob signifikante Unterschiede, welche die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin beeinflussen, zu finden sind (p -Wert $<0,05$). Da viele Parameter verglichen, d. h. viele Tests durchgeführt worden sind, musste die Problematik des multiplen Testens berücksichtigt werden, um die Wahrscheinlichkeit, dass ein Resistenzparameter fehlerhaft als zureffend (signifikant) angenommen wird, auszuschließen. Infolgedessen wurden die mit dem Permutationstest erhaltenen p -Werte nach Bonferroni korrigiert. Die mit der Bonferroni-Methode korrigierten p -Werte erhält man durch Multiplikation mit der Anzahl der durchgeführten Tests ($n_{\text{tests}} = 21$). Die Bonferroni-Methode dient dazu, die sogenannte Alphafehler-Kummulierung, also den Anstieg der Fehlerwahrscheinlichkeit bei Anstieg der Anzahl der Tests, zu korrigieren (korrigierter p -Wert $<0,05$). Da nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen keine signifikanten Ergebnisse zu erwarten sind, werden, um aus den statistischen Tests Informationen herauszuziehen, in der Folge auch die unkorrigierten p -Werte berichtet. Diese sind jedoch nur explorativ zu interpretieren.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

Die Durchsicht der mikrobiologischen Ergebnisse der Patienten mit CF, die im Christiane Herzog - Zentrum für Mukoviszidose der Universität Würzburg von 1999 bis 2009 behandelt worden sind, ergab bei 22 Patienten eine chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* (PA). Diese Patienten wurden in die Studie aufgenommen und vom Zeitpunkt des PA-Erstnachweises bis zum Jahr 2009 nachverfolgt.

Es wurden die Häufigkeit der Patientenbesuche im Christiane Herzog - Zentrum, die Regime der parenteralen Antibiotikatherapie sowie die Dauer und die Art der Inhalationstherapie anhand der Akten des Christine Herzog - Zentrums ermittelt. Die Anzahl der für die Mikrobiologie entnommenen Proben und die Ergebnisse der Untersuchungen wurden aus dem Archiv des IHM zur Verfügung gestellt. Anhand der mikrobiologischen Daten wurde zunächst der Zeitpunkt des Erstnachweises von PA bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Ergebnisse vom Zeitpunkt des Erstnachweises bis zum Studienende 2009 in Bezug auf Wachstum von PA und Empfindlichkeit der isolierten Stämme nachverfolgt und dokumentiert. Die Resultate der Empfindlichkeitsbestimmung der Erstisolate wurden mit den Ergebnissen der Folgeisolate verglichen und hinsichtlich einer Resistenzentwicklung ausgewertet.

4.1.1 Diagnosestellung Mukoviszidose

In die Studie konnten 10 Frauen und 12 Männer aufgenommen werden. Die Diagnose Mukoviszidose wurde im Alter zwischen 1 Jahr und 28 Jahren (Durchschnittsalter, arithmetischer Mittelwert 9,4 Jahre, Median 8,5 Jahre) gestellt. Vier Patienten (Patient 9, 11, 17, 19) verstarben vor Beendigung der Studie (Tabelle 6). Bei drei Patienten (Patient 3, 8, 15) waren die Unterlagen nur bis zum Jahr 2008 verfügbar.

Tabelle 6. Studienpatienten

Patient Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnose CF Jahr	Diagnose CF Lebensalter	Sterbejahr
1	weiblich	1983	1999	16 Jahre	----
2	weiblich	1991	1998	7 Jahre	----
3	weiblich	1987	1995	8 Jahre	----
4	männlich	1993	1998	5 Jahre	----
5	männlich	1987	1996	9 Jahre	----
6	männlich	1988	1989	1 Jahr	----
7	männlich	1986	1991	5 Jahre	----
8	männlich	1987	1999	12 Jahre	
9	weiblich	1983	1986	3 Jahre	2008
10	weiblich	1977	1989	12 Jahre	----
11	männlich	1980	1991	11 Jahre	2007
12	weiblich	1984	1991	7 Jahre	----
13	weiblich	1986	1991	5 Jahre	----
14	weiblich	1990	1991	1 Jahr	----
15	männlich	1974	1998	24 Jahre	----
16	weiblich	1983	1994	11 Jahre	----
17	männlich	1968	1996	28 Jahre	2009
18	männlich	1977	1979	2 Jahre	----
19	weiblich	1989	1990	1 Jahr	2006
20	männlich	1983	1990	7 Jahre	----
21	männlich	1983	1999	16 Jahre	----
22	männlich	1981	1996	15 Jahre	----
Durchschnitt (d)	----	----	----	9,4 Jahre	----
Median	----	----	----	8,5 Jahre	----

Durchschnitt (d): arithmetischer Mittelwert

4.1.2 Erstnachweis von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Erstbesiedlung der Patienten mit PA trat im Alter zwischen 1 Jahr und 28 Jahren (Durchschnittsalter, arithmetischer Mittelwert 12,5 Jahre, Median 12,5 Jahre) auf. Vier Patienten wurden schon im Alter von ≤ 5 Jahren besiedelt, bei 5 Patienten trat die Besiedlung zwischen 6 und 10 Jahren auf, bei 10 Patienten zwischen 11 und 20 Jahren, während 3 Patienten erst sehr spät nach dem 20. Lebensjahr PA akquirierten (Tabelle 7).

Bei der Diagnosestellung Mukoviszidose konnte bei 12 Patienten (54,5%) PA im Respirationstrakt nachgewiesen werden. Bei den übrigen 10 Patienten wurde nach einem Intervall von 1 Jahr bis zu 12 Jahren (Durchschnittsintervall,

arithmetischer Mittelwert 7 Jahre) nach Diagnosestellung eine Erstbesiedlung mit PA beobachtet (Tabelle 7).

Tabelle 7. Erstbesiedlung und chronische Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*

Pat. Nr.	Diagnose CF Jahr	Erstnachweis <i>P. aeruginosa</i> (PA)		Intervall zwischen CF-Diagnose und PA-Erstnachweis	PA-Elimination nach Eradikations-therapie		Chronische PA-Besiedlung	
		Jahr	Lebensalter		ja nein	Zeitspanne der Keim-elimination	Jahr	Lebensalter
1	1999	1999	16 Jahre	----	nein	----	1999	16 Jahre
2	1998	1998	7 Jahre	----	nein	----	1998	7 Jahre
3	1995	2001	14 Jahre	6 Jahre	nein	----	2001	14 Jahre
4	1998	1998	5 Jahre	----	nein	----	1998	5 Jahre
5	1996	1996	9 Jahre	----	ja	2 Jahre	1998	11 Jahre
6	1989	1989	1 Jahr	----	ja	6 Jahre	1995	7 Jahre
7	1991	1991	5 Jahre	----	ja	8 Jahre	1999	13 Jahre
8	1999	2000	13 Jahre	1 Jahr	nein	----	2000	13 Jahre
9	1986	1992	9 Jahre	6 Jahre	ja	5 Jahre	1997	14 Jahre
10	1989	1998	21 Jahre	9 Jahre	nein	----	1998	21 Jahre
11	1991	1991	11 Jahre	----	ja	2 Jahre	1993	13 Jahre
12	1991	1991	7 Jahre	----	nein	----	1991	7 Jahre
13	1991	1996	10 Jahre	5 Jahre	ja	7 Jahre	2003	17 Jahre
14	1991	1994	4 Jahre	3 Jahre	nein	----	1994	4 Jahre
15	1998	1998	24 Jahre	----	nein	----	1998	24 Jahre
16	1994	2001	18 Jahre	7 Jahre	nein	----	2001	18 Jahre
17	1996	1996	28 Jahre	----	ja	3 Jahre	1999	31 Jahre
18	1979	1989	12 Jahre	10 Jahre	nein	----	1989	12 Jahre
19	1990	2002	13 Jahre	12 Jahre	ja	2 Jahre	2004	15 Jahre
20	1990	2001	18 Jahre	11 Jahre	ja	3 Jahre	2004	21 Jahre
21	1999	1999	16 Jahre	----	nein	----	1999	16 Jahre
22	1996	1996	15 Jahre	----	nein	----	1996	15 Jahre
Durchschnitt (d)	----	----	12,5 Jahre	7 Jahre	----	4,2 Jahre	----	14,3 Jahre
Median	----	----	12,5 Jahre	6,5 Jahre	----	3,0 Jahre	----	14,0 Jahre

Durchschnitt (d): arithmetischer Mittelwert

4.1.3 Eradikationstherapie

Alle 22 Patienten wurden sofort nach dem PA-Erstnachweis einer Eradikationstherapie unterzogen. Diese war bei 9 (40,9%) Patienten erfolgreich (Patient 5, 6, 7, 9, 11, 13, 17, 19 und 20), während 13 Patienten chronisch besiedelt blieben. Im weiteren Verlauf kam es bei den Patienten, bei denen die Keimelimination zunächst gelungen war, nach einem Zeitraum von 2 bis 8 Jahren

(Durchschnittsintervall, arithmetischer Mittelwert 4,2 Jahre, Median 3,0 Jahre) zu einer erneuten, letztendlich dauerhaften Besiedlung mit PA (Tabelle 7).

4.1.4 Suppressionstherapie bei chronischer Besiedlung mit *P. aeruginosa*

Eine chronische PA-Besiedlung trat bei den Patienten im Alter von 4 bis 31 Jahren auf (Durchschnittsalter, arithmetischer Mittelwert 14,3 Jahre, Median 14,0 Jahre); mit 20 Jahren waren 18 Patienten (81,2%) und mit 31 Jahren 100% Patienten chronisch mit PA besiedelt. Alle chronisch besiedelten Patienten erhielten eine Suppressionstherapie (Tabelle 7).

4.2 Mikrobiologische Ergebnisse

4.2.1 Besiedlungsrate mit *Pseudomonas aeruginosa*

Tabelle 8. Besiedlungsrate mit *Pseudomonas aeruginosa* (Erstisolation bis Studienende)

Pat. Nr.	Anzahl Proben	Anzahl der <i>Pseudomonas-aeruginosa</i> -Isolate		
		gesamt	nicht-mukoid	mukoid
1	64	106	57	49
2	57	43	41	2
3	64	122	53	69
4	41	48	30	18
5	57	85	32	53
6	79	114	44	70
7	51	74	66	8
8	40	29	29	0
9	74	94	94	0
10	74	92	92	0
11	66	80	56	24
12	79	135	84	51
13	65	34	22	12
14	77	98	78	20
15	83	51	51	0
16	49	68	68	0
17	42	75	30	45
18	94	188	188	0
19	19	47	46	1
20	35	50	28	22
21	64	128	67	61
22	80	83	75	8
Summe	1354	1844	1331 (72,2%)	513 (27,8%)

Bis zum Studienende im Jahr 2009 wurden im Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) 1.354 Proben aus dem Respirationstrakt chronisch besiedelter Patienten mit CF in der Routinediagnostik auf das Vorhandensein von PA untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden vom IHM für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es konnten 1.844 Stämme angezchtet und weiter analysiert werden.

4.2.2 Morphologie der *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolate

Von 1.844 Stämmen waren 1.331 (72,2%) nicht-mukoid, 513 (27,8%) Stämme zeigten mukoides Wachstum und waren bei 72,7% der Patienten nachweisbar (Tabellen 8, 9).

4.2.2.1 Mukoide Stämme

Der Nachweis mukoider Stämme wurde erstmals im Alter von 9 Jahren und spätestens im Alter von 32 Jahren beobachtet (Durchschnittsalter, arithmetischer Mittelwert 17,2 Jahre), d. h. vor dem 9. Lebensjahr wurde bei den besiedelten Patienten nur nicht-mukoide Isolate nachgewiesen. Die Umwandlung nicht-mukoider in mukoide Phänotypen dauerte durchschnittlich 6,0 Jahre (arithmetischer Mittelwert) nach Erstnachweis von PA (Tabelle 9). Manche Patienten bildeten schon nach 2 Jahren mukoide Stämme, bei anderen dauerte es bis zu 13 Jahren (Patient 11). Bei zwei Patienten (Patient 3 und 5) waren schon bei der Erstisolation mukoide Pseudomonaden nachweisbar. Die Patienten, bei denen die Umwandlung länger dauerte, hatten in der Regel weniger parenterale Therapiezyklen pro Jahr erhalten als Patienten, bei denen sich rasch mukoide Phänotypen bildeten (Tabelle 9).

4.2.3 Empfindlichkeitsprüfung von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Empfindlichkeitsprüfung von PA wurde im Rahmen der Routinediagnostik leitliniengerecht, wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben, vom IHM durchgeführt, die Ergebnisse wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9. Nachweis mukoider *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämme

Pat. Nr.	PA-Erst-nachweis Jahr	Anzahl der PA-Isolate			Erstnachweis mukoider Stämme			Therapiezyklen (intravenös) pro Jahr bis zur Bildung mukoider Stämme
		gesamt	nicht-mukoid	mukoid	Jahr	Intervall* Jahre	Alter Jahre	
1	1999	106	57	49	2001	2	18	2,5
2	1998	43	41	2	2004	6	13	1,3
3	2001	122	53	69	2001	0	14	0
4	1998	48	30	18	2003	5	10	2,4
5	1996	85	32	53	1996	0	9	----
6	1989	114	44	70	1998	9	10	0,3
7	1991	74	66	8	2000	9	14	0,6
8	2000	29	29	0	----	----	----	----
9	1992	94	94	0	----	----	----	----
10	1998	92	92	0	----	----	----	----
11	1991	80	56	24	2004	13	24	0,9
12	1991	135	84	51	2001	10	17	0,8
13	1996	34	22	12	2004	8	18	1,3
14	1994	98	78	20	2005	11	15	2,4
15	1998	51	51	0	----	----	----	----
16	2001	68	68	0	----	----	----	----
17	1996	75	30	45	2000	4	32	1
18	1989	188	188	0	----	----	----	----
19	2002	47	46	1	2006	4	17	3,5
20	2001	50	28	22	2006	5	23	1,4
21	1999	128	67	61	2001	2	18	0
22	1996	83	75	8	2004	8	23	3
Summe		1844	1331 (72,2%)	513 (27,8%)	----	----	----	----
Durchschnitt (d)		----	----	----	----	6,0	17,2	----
Median		----	----	----	----	5,5	17,0	----

* Intervall vom PA-Erstnachweis bis zum Nachweis mukoider PA-Stämme; d: arithmetischer Mittelwert

4.2.3.1 Validität der routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfung

Die Validität der in der Routineuntersuchung ermittelten Empfindlichkeit von PA gegen Tobramycin und Colistin wurde von Dr. Valenza im IHM vor Studienbeginn (2009) überprüft. Es wurden anhand einer vergleichenden Testung 300 stichprobenartig ausgesuchte kryokonservierte Isolate der CF-Studienpatienten, wie in Kapitel 3.5.6.6 beschrieben, untersucht.

Tabelle 10. Validität der in der Routinediagnostik ermittelten Empfindlichkeit von PA (Pat. 1)

Nachweis von PA		Colistin-MHK			Tobramycin-MHK			Tobramycin S I R
Jahr	Monat	Etest® 2009 µg/mL	Mikro-dilution Archiv IHM	Akte Archiv Klinik	Etest® 2009 µg/mL	Mikro-dilution Archiv IHM	Akte Archiv Klinik	Agar-diffusion 2009
2004	Januar	0,125	S	S	2	S	S	S
	März	0,125	S	S	0,75	S	S	S
	August	0,25	S	S	0,75	S	S	S
	September	0,5	S	S	2	S	S	S
	Oktober	0,25	S	S	0,5	S	S	S
	Dezember	0,125	S	S	1	S	S	S
2005	Februar	0,047	S	S	0,5	S	S	S
	Juni	0,25	S	S	0,5	S	S	S
	Dezember	0,25	S	S	1,5	S	S	S
2006	Februar	0,38	S	S	1	S	S	S
	Juli	0,25	S	S	2	S	S	S
	September	0,125	S	S	32	R	R	R
2007	Februar	0,125	S	S	2	S	S	S
	Februar	0,19	S	S	2	S	S	S
	Mai	0,38	S	S	1	S	S	S
2008	Februar	0,38	S	S	1,5	S	S	S
	April	0,5	S	S	1,5	S	S	S
	September	0,38	S	S	2	S	S	S
	Dezember	0,38	S	S	0,5	S	S	S
2009	Februar	0,25	S	S	2	S	S	S
	April	0,25	S	S	2	S	S	S
	Mai	0,19	S	S	1,5	S	S	S
	September	0,38	S	S	1	S	S	S
	Dezember	0,5	S	S	1	S	S	S

Colistin-MHK: S = ≤ 2 µg/mL; Tobramycin-MHK: S = ≤ 4 µg/mL, I = 8 µg/mL, R = ≥ 8 µg/mL;
S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

Die Ergebnisse wurden mit den in der Routinediagnostik ermittelten (Archiv IHM) und in der Akte dokumentierten Werten (Christiane Herzog - Zentrum) verglichen. Es ergaben sich keine Diskrepanzen in der Sensitivität. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind am Beispiel von Patientin 1 in Tabelle 10 dargestellt.

4.2.4 Resistenz von *P. aeruginosa* gegen Tobramycin und Colistin

4.2.4.1 *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolate

4.2.4.1.1 Resistenz gegen Tobramycin

Von 1.844 PA-Isolaten waren 560 (30,4%) Stämme resistent gegen Tobramycin, 24 Stämme waren mukoid (4,3%), 536 (95,7%) waren nicht-mukoid (Tabelle 11).

Tabelle 11. Resistenzen der PA-Isolate gegen Tobramycin und Colistin (Erstisolation bis 2009)

Patient Nr.	Anzahl PA-Isolate	Resistente PA-Isolate gegen				
		Tobramycin				Colistin
		Anzahl	Prozent	mukoid Anzahl	nicht-mukoid Anzahl	Anzahl
1	106	13	12,3%	0	13	0
2	43	34	79,1%	1	33	0
3	122	5	4,1%	1	4	0
4	48	0	0	----	----	0
5	85	0	0	----	----	0
6	114	16	14%	0	16	0
7	74	17	23%	1	16	0
8	29	0	0	----	----	0
9	94	2	2,1%	0	2	0
10	92	92	100%	0	92	0
11	80	0	0	----	----	0
12	135	55	40,7%	7	48	0
13	34	0	0	----	----	0
14	98	20	20,4%	0	20	0
15	51	51	100%	0	51	0
16	68	3	4,4%	0	3	0
17	75	5	6,7%	0	5	0
18	188	118	62,8%	0	118	0
19	47	2	4,3%	0	2	0
20	50	0	0	----	----	0
21	128	44	34,4%	6	38	0
22	83	83	100%	8	75	0
Summe	1844	560 (30,4%)		24 (4,3%)	536 (95,7%)	0

In einer Sputumprobe variierten die PA-Isolate in der Empfindlichkeit gegen Antibiotika beträchtlich. So konnten z. B. bei Patient 18 aus einer Sputumprobe drei PA-Stämme unterschiedlicher Sensitivität (darunter ein Tobramycin-sensibler Stamm und zwei Tobramycin-resistente Stämme) isoliert werden (Tabelle 12). Generell wurden die Stämme mit zunehmender Besiedlungsdauer bzw. bei chronischer Besiedlung resistenter gegen alle Antibiotikaklassen (siehe z. B. Patient 12 und Patient 18 in Tabelle 12).

Tabelle 12. Empfindlichkeit verschiedener PA-Isolate (Patient 18 und Patient 12)

Antibiotikum	Patient 18							Patient 12		
	PA-Isolate							PA-Isolate		
	März 2006		März 2007		Mai 2007			1991	2000	2007
	1	2	1	2	1	2	3	1	1	1
Piperacillin	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R
Ceftazidim	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R
Meropenem	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Tobramycin	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R
Amikacin	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R
Aztreonam	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
Colistin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

4.2.4.1.2 Resistenz gegen Colistin

Über den gesamten Studienzeitraum konnten zu keinem Zeitpunkt Resistenzen gegen Colistin beobachtet werden (Tabelle 11). Bei zwei Patienten (Patient 18 und 21) waren zwischendurch, aber nicht kontinuierlich, sensible Isolate mit erhöhten MHK-Werten von 1,0 µg/mL und 1,5 µg/mL zu beobachten.

4.2.4.2 Patienten

Insgesamt traten bei 16 Patienten (72,7%) Tobramycin-resistente Stämme auf, bei sechs Patienten war zu keinem Zeitpunkt eine Tobramycin-Resistenz zu beobachten (Patient 4, 5, 8, 11, 13, 20). Die Resistenz gegen Tobramycin entwickelte sich in einem Zeitraum von 1 Jahr bis zu 10 Jahren nach der Erstisolation (Durchschnittsintervall, arithmetischer Mittelwert 5,25 Jahre, Median 4,5 Jahre) im Lebensalter von 7 bis 33 Jahren (Durchschnittsalter, arithmetischer Mittelwert 17,1 Jahre, Median 16,0 Jahre) (Tabelle 13).

Tabelle 13. Tobramycin-Resistenz der PA-Isolate verschiedener Patientengruppen (Erstnachweis bis Studienende 2009)

Pat. Nr.	PA-Isolate Anzahl	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
		Erstnachweis		Nachweis der Tobramycin-Resistenz					
		Jahr	Lebensalter	Jahr	Lebensalter	Intervall*	Isolate		
							Anzahl	Prozent	
Gruppe 1: initiale Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen									
1	106	1999	16 Jahre	1999	16 Jahre	0	13	12,3%	
10	92	1998	21 Jahre	1998	21 Jahre	0	92	100%	
15	51	1998	24 Jahre	1998	24 Jahre	0	51	100%	
22	83	1996	15 Jahre	1996	15 Jahre	0	83	100%	
Durchschnitt (d)		----	19 Jahre	----	19 Jahre	----	----	78,1%	
Gruppe 2: dauerhafte Besiedlung mit Tobramycin-sensiblen und -resistenten Stämmen (39,2%)									
2	43	1998	7 Jahre	2001	10 Jahre	3 Jahre	34	79,1%	
6	114	1989	1 Jahr	1998	10 Jahre	9 Jahre	16	14%	
7	74	1991	5 Jahre	2000	14 Jahre	9 Jahre	17	23%	
12	135	1991	7 Jahre	1998	14 Jahre	7 Jahre	55	40,7%	
14	98	1994	4 Jahre	1997	7 Jahre	3 Jahre	20	20,4%	
18	188	1989	12 Jahre	1993	16 Jahre	4 Jahre	118	62,8%	
21	128	1999	16 Jahre	2001	18 Jahre	2 Jahre	44	34,4%	
Durchschnitt (d)		----	7,4 Jahre	----	12,7 Jahre	5,3 Jahre	----	39,2%	
Gruppe 3: passagere Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen (4,3%)									
3	122	2001	14 Jahre	2002	15 Jahre	1 Jahr	5	4,1%	
9	94	1992	9 Jahre	2002	19 Jahre	10 Jahre	2	2,1%	
16	68	2001	18 Jahre	2008	25 Jahre	7 Jahre	3	4,4%	
17	75	1996	28 Jahre	2001	33 Jahre	5 Jahre	5	6,7%	
19	47	2002	13 Jahre	2005	16 Jahre	3 Jahre	2	4,3%	
Durchschnitt (d)		----	16,4 Jahre	----	21,6 Jahre	5,2 Jahre	----	4,3%	
Gruppe 4: keine Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen									
4	48	1998	5 Jahre	----	----	----	----	----	
5	85	1996	9 Jahre	----	----	----	----	----	
8	29	2000	13 Jahre	----	----	----	----	----	
11	80	1991	11 Jahre	----	----	----	----	----	
13	34	1996	10 Jahre	----	----	----	----	----	
20	50	2001	18 Jahre	----	----	----	----	----	
Durchschnitt (d)		----	11 Jahre	----	----	----	----	----	
Gesamtbewertung									
Durchschnitt (d)		----	12,5 Jahre	----	17,1 Jahre	5,25 Jahre	----	----	
Median		----	12,5 Jahre	----	16,0 Jahre	4,5 Jahre	----	----	

*Intervall zwischen PA-Erstnachweis und Resistenzentwicklung gegen Tobramycin;
Durchschnitt (d): arithmetischer Mittelwert

Bei 4 Patienten (Patient 10, 15, 18, 22) wurde eine high level Resistenz (HLR) mit MHK-Werten von $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ beobachtet. Bei den übrigen 18 Patienten schwankte die Resistenz zwischen MHK-Werten von 16 bis $64 \mu\text{g/mL}$, d. h. bei diesen Stämmen lag eine low level resistance (LLR) vor.

Vier Patienten wiesen schon zu Studienbeginn Tobramycin-resistente Stämme auf (Patient 1, 10, 15, 22), fünf Patienten (Patient 3, 9, 16, 17, 19) waren nur passager mit Tobramycin-resistenten Stämmen besiedelt (4,3% der Stämme), so dass die Rate der Patienten, die eine kontinuierliche Tobramycin-Resistenz entwickelten, bei 7 Patienten (31,8%) lag.

Je nach der Rate Tobramycin-resistenter Isolate im Beobachtungszeitraum ließen sich die Patienten in die folgenden 4 Gruppen einteilen (Tabelle 13):

Gruppe 1: Vier Patienten, die initial, d. h. schon bei Erstnachweis, mit Tobramycin-resistenten PA-Stämmen besiedelt waren; bei ihnen lag keine sekundäre Resistenzentwicklung vor. Drei Patienten (Patient 10, 15, 22) waren über den gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich mit resistenten Stämmen besiedelt, bei einer Patientin (Patientin 1) waren resistente Stämme nicht kontinuierlich, sondern nur immer wieder neben Tobramycin-sensiblen Stämmen nachweisbar.

Gruppe 2: Sieben Patienten, die im Studienzeitraum eine dauerhafte Besiedlung mit Tobramycin-resistenten und -sensiblen PA-Stämmen bzw. eine hohe Rate Tobramycin-resistenter PA-Stämme aufwiesen; bei drei von ihnen war am Studienende eine überwiegend resistente PA-Population zu beobachten (Patient 2, 18, 21).

Gruppe 3: Fünf Patienten, die im Studienzeitraum eine passagere Besiedlung mit Tobramycin-resistenten PA-Stämmen (2 - 5 resistente PA-Stämme pro Patient im gesamten Studienzeitraum), d. h. eine niedrige Rate Tobramycin-resistenter PA-Stämme aufwiesen.

Gruppe 4: Sechs Patienten, bei denen zu keinem Zeitpunkt Tobramycin-resistente PA-Stämme nachweisbar waren.

4.2.5 Einfluss auf die Tobramycin-Resistenzentwicklung

Der Einfluss auf die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin ist in den Tabellen 13 und 14 dargestellt; bei den durchschnittlichen Werten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte.

4.2.5.1 Lebensalter bei Erstbesiedlung

Die Erstbesiedlung mit PA trat in einem Durchschnittsalter von 12,5 Jahren auf (Tabelle 13). Im Durchschnitt waren die Patienten der **Gruppe 1** beim Erstnachweis von PA 19 Jahre alt, Patienten der **Gruppe 2** waren 7,4 Jahre alt. Bei Patienten der **Gruppe 3** erfolgte der Erstnachweis bei einem Durchschnittsalter von 16,4 Jahren, bei Patienten der **Gruppe 4** mit 11 Jahren (Tabelle 13).

Beim Vergleich der Gruppen 2 und 3 zeigte sich im Permutationstest ein signifikanter Unterschied (unkorrigiertes $p = 0,025$), der nach der Bonferroni-Korrektur nicht bestätigt werden konnte. Beim Vergleich der Gruppen 2 und 4 bzw. der Gruppen 3 und 4 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Permutationstest ($p = 0,203$ bzw. $p = 0,175$).

4.2.5.2 Lebensalter bei Nachweis der Tobramycin-Resistenz

Die Tobramycin-Resistenz trat im Durchschnittsalter von 17,1 Jahren auf. Das durchschnittliche Lebensalter der Patienten beim Auftreten der Tobramycin-Resistenz in **Gruppe 1** war 19 Jahre, in **Gruppe 2** waren es 12,7 Jahre, und in **Gruppe 3** waren es 21,6 Jahre (Tabelle 13).

Das Intervall vom Erstnachweis von PA bis zum Auftreten Tobramycin-resistenter Phänotypen machte bei den Patienten der **Gruppe 2** im Durchschnitt 5,3 Jahre (2 bis 9 Jahre) aus, bei den Patienten der **Gruppe 3** waren es im Durchschnitt 5,2 Jahre (1 Jahr bis 10 Jahre) (Tabelle 13).

Tabelle 14. Resistenzentwicklung von Tobramycin unter der Suppressionstherapie

Pat. Nr.	Beginn der Suppressionstherapie		Tobramycin-Resistenz			Zyklen intravenöser Antibiotikatherapie			Inhalation Wochen		Therapiedauer ²
	Jahr	Lebensalter	Nachweis Jahr	Intervall Jahre ¹	Isolate	gesamt	Tobramycin		Colistin	Tobramycin / Gentamicin*	
							gesamt	bis zur Resistenz			
Gruppe 1: initiale Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen											
1	1999	16 Jahre	1999	0	12,3%	30	29	----	184	164	10 Jahre
10	1998	21 Jahre	1998	0	100%	26	8	----	280	0	11 Jahre
15	1998	24 Jahre	1998	0	100%	10	1	----	284	0	10 Jahre
22	1996	15 Jahre	1996	0	100%	49	9	----	268	4	13 Jahre
Durchschnitt		19,0 Jahre	----	----	78,1%	28,8	11,8	----	254	42	11 Jahre
Gruppe 2: dauerhafte Besiedlung mit Tobramycin-sensiblen und -resistenten Stämmen (39,2%)											
2	1998	7 Jahre	2001	3	79,1%	20	15	1	180	236	11 Jahre
6	1995	7 Jahre	1998	3	14%	34	33	3	292	152	14 Jahre
7	1999	13 Jahre	2000	1	23%	17	14	2	376	64	10 Jahre
12	1991	7 Jahre	1998	7	40,7%	25	17	5	368	112*	18 Jahre
14	1994	4 Jahre	1997	3	20,4%	40	35	1	132	188*	15 Jahre
18	1989	12 Jahre	1993	4	62,8%	26	15	0	152	144*	20 Jahre
21	1999	16 Jahre	2001	2	34,4%	28	21	2	164	44	10 Jahre
Durchschnitt		9,4 Jahre	----	3,3	39,2%	27,1	21,4	2,0	222,3	134,3	14 Jahre
Gruppe 3: passagere Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen (4,3%)											
3	2001	14 Jahre	2002	1	4,1%	26	26	2	188	40	7 Jahre
9	1997	14 Jahre	2002	5	2,1%	43	34	18	148	80*	11 Jahre
16	2001	18 Jahre	2008	7	4,4%	24	14	14	200	20	8 Jahre
17	1999	31 Jahre	2001	2	6,7%	21	19	3	92	64	10 Jahre
19	2004	15 Jahre	2005	1	4,3%	16	16	4	32	20	3 Jahre
Durchschnitt		18,4 Jahre	----	3,2	4,3%	26	21,8	8,2	132	44,8	7,8 Jahre
Gruppe 4: keine Besiedlung mit Tobramycin-resistenten Stämmen											
4	1998	5 Jahre	----	----	----	28	28	----	328	28*	11 Jahre
5	1998	11 Jahre	----	----	----	31	29	----	96	192	11 Jahre
8	2000	13 Jahre	----	----	----	19	19	----	272	44	8 Jahre
11	1993	13 Jahre	----	----	----	21	19	----	144	56	14 Jahre
13	2003	17 Jahre	----	----	----	11	11	----	124	44	6 Jahre
20	2004	21 Jahre	----	----	----	17	16	----	100	40	5 Jahre
Durchschnitt		13,3 Jahre	----	----	----	21,2	20,3	----	177,3	67,3	9,2 Jahre
Gesamtbewertung											
Summe		----	----	----	----	562	428	----	4404	1736	----
Durchschnitt		14,3 Jahre	----	3,25	----	25,5	19,5	----	200,2	78,9	10,7 Jahre

¹Intervall zwischen Beginn der Suppressionstherapie und Tobramycin-Resistenzentwicklung; ²Dauer der Suppressionstherapie; *vor 1997 erhielten die Patienten initial auch Gentamicin: Patient 4: 4 von 28 Wochen, Patient 9: 12 von 80 Wochen, Patient 12: 44 von 112 Wochen, Patient 14: 32 von 188 Wochen, Patient 18: 12 von 144 Wochen; Durchschnitt (d): arithmetischer Mittelwert

4.2.5.3 Lebensalter bei Beginn der Suppressionstherapie

Die Suppressionstherapie wurde im Durchschnittsalter von 14,3 Jahren bei chronischer Besiedlung begonnen (Tabelle 14). Im Durchschnitt waren Patienten der **Gruppe 1** zu Beginn der Suppressionstherapie 19 Jahre alt, Patienten der **Gruppe 2** waren 9,4 Jahre alt. Bei Patienten der **Gruppe 3** wurde im Durchschnitt von 18,4 Jahren mit der Suppressionstherapie begonnen und bei Patienten der **Gruppe 4** im Durchschnitt mit 13,3 Jahren (Tabelle 14).

Der Vergleich der Gruppen 2 und 3 ergab im Permutationstest einen signifikanten Unterschied (unkorrigiertes $p = 0,015$), nach der Bonferroni-Korrektur wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Beim Vergleich von Gruppe 2 mit 4 bzw. Gruppe 3 mit 4 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,174$ bzw. $p = 0,253$) im Permutationstest.

Das Intervall vom Beginn der Suppressionstherapie bis zur Resistenzentwicklung gegen Tobramycin lag bei den Patienten der **Gruppe 2** bei 3,3 Jahren und bei den Patienten der **Gruppe 3** bei 3,2 Jahren (Durchschnittsintervall 3,25 Jahre) (Tabelle 14).

4.2.5.4 Dauer der Suppressionstherapie

Die Dauer der Suppressionstherapie ist in Tabelle 14 gezeigt (Durchschnitt = arithmetischer Mittelwert).

Die mit PA besiedelten Patienten wurden über einen Zeitraum von 3 bis 20 Jahren (arithmetischer Mittelwert 10,7 Jahre pro Patient) parenteral mit Antibiotika und inhalativ mit Tobramycin oder Colistin behandelt. Die Dauer der Suppressionstherapie betrug bei Patienten der **Gruppe 1** im Durchschnitt 11 Jahre, bei Patienten der **Gruppe 2** waren es 14 Jahre im Durchschnitt, bei Patienten der **Gruppe 3** lag die durchschnittliche Dauer der Suppressionstherapie bei 7,8 Jahren, bei Patienten der **Gruppe 4** waren es 9,2 Jahre (Tabelle 14).

Im Permutationstest zeigte sich beim Vergleich der Gruppen 2 und 3 sowie der Gruppen 2 und 4 ein signifikanter Unterschied (unkorrigiertes $p = 0,018$ bzw. $p = 0,047$). Beim Vergleich von Gruppe 3 mit 4 war kein signifikanter Unterschied (p

= 0,524) feststellbar. Nach der Bonferroni-Korrektur konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.2.5.5 Dauer der Inhalationstherapie mit Tobramycin bzw. Colistin

Die Therapieregime der Gruppen 1 bis 4 finden sich in Tabelle 14 (Durchschnitt = arithmetischer Mittelwert).

Die Inhalationstherapie bestand aus 4.404 Wochen Colistin (durchschnittlich 200,2 Wochen pro Patient) und 1.736 Wochen Tobramycin (im Durchschnitt 78,9 Wochen pro Patient). Bei den Patienten der **Gruppe 1** wurde eine Inhalationstherapie mit Tobramycin über 42 Wochen im Durchschnitt, mit Colistin über 254 Wochen durchgeführt; bei Patienten der **Gruppe 2** erfolgte die Inhalationstherapie mit Tobramycin über 134,3 Wochen, mit Colistin über 222,3 Wochen; die Patienten der **Gruppe 3** erhielten inhalativ über 44,8 Wochen Tobramycin und über 132 Wochen Colistin; die Patienten der **Gruppe 4** inhalierten 67,3 Wochen mit Tobramycin und 177,3 Wochen mit Colistin.

Tobramycin-Inhalation: Der Vergleich der Gruppen 2 und 3 zeigte im Permutationstest einen signifikanten Unterschied (unkorrigiertes $p = 0,022$). Dies war beim Vergleich von Gruppe 2 mit 4 bzw. von Gruppe 3 mit 4 nicht zu beobachten ($p = 0,092$ bzw. $p = 0,662$). Nach der Bonferroni-Korrektur konnte die Signifikanz nicht bestätigt werden.

Colistin-Inhalation: Beim statistischen Vergleich der Gruppen 2 und 3, der Gruppen 2 und 4 sowie der Gruppen 3 und 4 ergaben sich im Permutationstest keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,085$ bzw. $p = 0,301$ bzw. $0,409$).

4.2.5.6 Dauer der parenteralen Antibiotikatherapie (Zahl der Zyklen)

Im Studienzeitraum erhielten die Patienten insgesamt 562 Zyklen PA-wirksame Antibiotika als Kombinationstherapie mit zwei PA-wirksamen Antibiotika (durchschnittlich 25,5 Zyklen pro Patient) (arithmetischer Mittelwert). Ein Zyklus entspricht einer 14-tägigen parenteralen Antibiotikatherapie. Von diesen 562 Zyklen wurden 428 Zyklen in Kombination mit Tobramycin appliziert (19,5 Zyklen pro Patient).

Im Durchschnitt erhielten die Patienten der **Gruppe 1** eine parenterale Therapie mit Tobramycin von 11,8 Zyklen, bei Patienten der **Gruppe 2** waren es 21,4 Zyklen, bei Patienten der **Gruppe 3** waren es 21,8 Zyklen, und die Patienten der **Gruppe 4** erhielten im Durchschnitt 20,3 Zyklen Tobramycin (Tabelle 14).

Bis zur Resistenzentwicklung erhielten die **Gruppe-2**-Patienten 14 Zyklen systemische Tobramycintherapie (durchschnittlich 2 Zyklen pro Patient), bei Patienten der **Gruppe 3** waren es 41 Zyklen parenteraler Tobramycintherapie (durchschnittlich 8,2 Zyklen pro Patient) (Tabelle 14).

Beim Vergleich der Gruppen 2 und 3, der Gruppen 2 und 4 sowie der Gruppen 3 und 4 zeigten sich im Permutationstest keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,843$ bzw. $p = 0,194$ bzw. $0,422$).

4.2.5.7 Zusammenfassung der Einflüsse auf die Resistenzentwicklung

Die Einflüsse auf die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin in den Patientengruppen 2 bis 4 wurde zusammengefasst und statistisch bewertet. Die Gruppeneinteilung der Patienten wurde aufgrund der Tobramycin-Resistenz vorgenommen. Patienten der Gruppe 1 wurden nicht berücksichtigt, da Gruppe 1 bereits beim Erstnachweis von PA mit resistenten Stämmen besiedelt war und eine sekundäre Resistenzentwicklung unter antibiotischer Therapie infolgedessen nicht nachweisbar war. Die in Tabelle 15 aufgezeigten Parameter wurden als Einflussgrößen ausgewertet.

Beim Vergleich der Patienten von Gruppe 2, 3 und 4 ergaben sich die folgenden Unterschiede in den Ergebnissen (Tabelle 15):

Die Patienten der Gruppe 2 waren bei Erstnachweis von PA und bei Beginn der Suppressionstherapie jünger als die Patienten der Gruppen 3 und 4 (Tabelle 13, 14), sie inhalierten über einen längeren Zeitraum mit Tobramycin. Die Gruppen 3 und 4 erhielten eine kürzere Suppressionstherapie als die Gruppe 2. Nach Vergleich mit dem Permutationstest waren diese Parameter für die Resistenzentwicklung gegen Tobramycin signifikant (unkorrigierter p-Wert $< 0,05$). Aufgrund der großen Anzahl an Tests wurden die p-Werte entsprechend

der Bonferroni-Methode korrigiert. Die korrigierten p-Werte ergaben, wie zu erwarten, keine Signifikanz.

Tabelle 15. Einflüsse auf die Resistenz von PA gegen Tobramycin unter Suppressionstherapie

Patientengruppe Tobramycinresistenz in %	Gruppe 2 39,2%	Gruppe 3 4,3%	Gruppe 4 0%	Statistischer Vergleich (Permutationstest, Bonferroni-Test*)		
				Gruppe 2 vs. Gruppe 3	Gruppe 2 vs. Gruppe 4	Gruppe 3 vs. Gruppe 4
Nachweis der Erstbesiedlung (Lebensalter in Jahren)	7,4	16,4	11,0	p = 0,025 (p = 0,525*)	p = 0,203	p = 0,1753
Lebensalter bei Beginn der Suppressionstherapie (Jahre)	9,4	18,4	13,3	p = 0,015 (p = 0,315*)	p = 0,174	p = 0,253
Dauer der Suppressionstherapie (Jahre)	14	7,8	9,2	p = 0,018 (p = 0,378*)	p = 0,047 (p = 0,987*)	p = 0,524
Dauer der Inhalationstherapie mit Tobramycin (Wochen)	134,3	44,8	67,3	p = 0,022 (p = 0,462*)	p = 0,092	p = 0,662
Dauer der Inhalationstherapie mit Colistin (Wochen)	222,3	132	177,3	p = 0,085	p = 0,301	p = 0,409
Anzahl der Gesamtzyklen der Tobramycintherapie i.v.	21,4	21,8	20,3	p = 0,909	p = 0,796	p = 0,695
Anzahl der Gesamtzyklen der i.v.- Antibiotikatherapie	27,1	26	21,2	p = 0,843	p = 0,194	p = 0,422

*nach Bonferroni korrigierte Werte in Klammern

4.3 Molekulargenetische Untersuchungen (Genotypisierung)

4.3.1 Genotypen von *Pseudomonas aeruginosa*

Die molekulargenetische Typisierung der Isolate von *P. aeruginosa* (PA) wurde mit der RAPD-Technik, wie von Mahenthiralingam und Mitarbeitern [72] beschrieben, von Dr. Valenza (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) durchgeführt. Die Daten wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die molekulargenetischen Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob die Patienten mit CF im Krankheitsverlauf mit gleichen oder verschiedenen Genotypen besiedelt sind und ob unter der Suppressionstherapie aufgrund der phänotypischen Vielfalt der PA-Stämme neue Genotypen aufgenommen werden oder eine klonale Variation bei gleichem Genotyp zu beobachten ist.

Zur Abklärung wurden einige PA-Stämme stichprobenartig molekulargenetisch untersucht. Ausgewählt wurden die Isolate, die schon bei Erstdiagnose resistent gegen Tobramycin waren (Patient 10, 15 und 22), ferner vier von sieben Isolaten, bei denen sich unter der Suppressionstherapie eine Resistenz gegenüber Tobramycin entwickelte oder nachweisbar war (Patient 2, 6, 18 und 21). Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Genotypischer Vergleich von PA-Isolaten mittels RAPD Analyse (Primer 272)

Patient Nr.	PA-Isolat	PA-Nachweis Jahr	PA mukoid	Tobramycin-Sensitivität		RAPD-Genotyp
				MHK µg/mL	S I R	
2	2a	2004	ja	0.25	S	1
	2b	2008	nein	64	R	1
6	6a	2004	ja	2	S	2
	6b	2008	nein	1.5	S	2
10	10a	2004	nein	>256	R	3
	10b	2008	nein	>256	R	3
15	15a	2004	nein	>256	R	3
	15b	2008	nein	>256	R	3
18	18a	2004	ja	1.5	S	3
	18b	2008	ja	2	S	3
	18c	2004	nein	>256	R	3
	18d	2008	nein	>256	R	3
21	21a	2004	ja	2	S	4
	21b	2008	nein	16	R	4
22	22a	2004	nein	>256	R	5
	22b	2008	nein	>256	R	5

S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

Mit Hilfe der RAPD-Analyse konnte gezeigt werden, dass die molekulargenetisch untersuchten Patienten 2 und 18 (Abbildung 21) sowie die Patienten 6 und 21 (Abbildung 22) mit verschiedenen Genotypen besiedelt waren und dass jeder Patient über den gesamten Beobachtungszeitraum lediglich einen Genotyp aufwies, auch wenn sich die Stämme phänotypisch und in der Tobramycin-Resistenz unterschieden (Tabellen 16, 17, Abbildungen 21, 22). Der gleiche Genotyp konnte mehrere morphologisch verschiedene Varianten, z. B. mukoid oder nicht-mukoid, aufweisen (z. B. Patient 6) und sich in der Tobramycin-Resistenz (resistente und sensible Varianten) unterscheiden (z. B. Patient 2 und 18) (Abbildung 21) (Tabellen 16, 17).

Tabelle 17. Antibiotika-Empfindlichkeit verschiedener PA-Isolate des Genotyps 3 (Patient 18)

Antibiotikum	Isolate (nicht-mukoid)								
	Mai 2007			März 2007		Februar 2007		März 2006	
	1	2	3	1	2	1	2	1	2
Piperacillin	R	S	R	S	R	R	S	S	S
Ceftazidim	R	R	R	S	R	R	S	S	S
Meropenem	S	S	I	S	S	R	S	R	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramycin	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Amikacin	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Aztreonam	R	R	S	S	R	S	S	S	S
Colistin	S	S	S	S	S	S	S	S	S

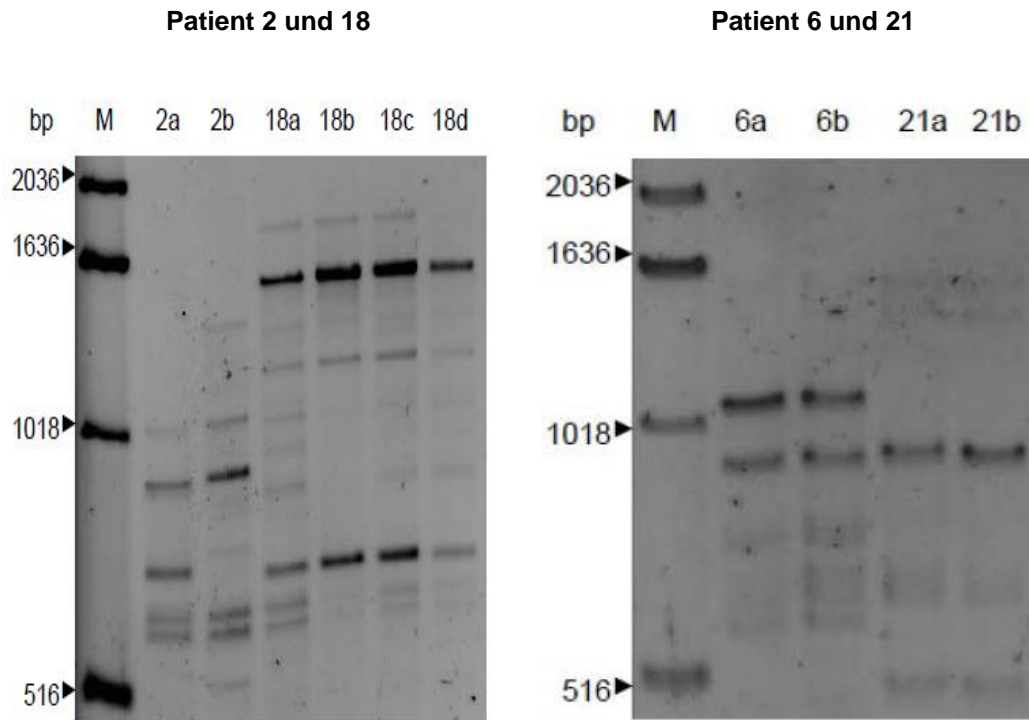
S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

4.3.2 Übertragung von resistenten *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämmen

Die RAPD-Analyse ergab weiterhin, dass es sich bei zwei von den drei Patienten (Patient 10, 15, 22), die initial mit resistenten PA-Stämmen (HLR) besiedelt waren, um identische Stämme des Genotyps 3 handelte (Patient 10 und 15). Der dritte Patient (Patient 22), der ebenfalls mit einem HLR-Stamm besiedelt war, unterschied sich im Genotyp von den Stämmen der Patienten 10 und 15. Bei ihm handelte es sich um den RAPD-Genotyp 5 (Tabelle 16, Abbildung 23).

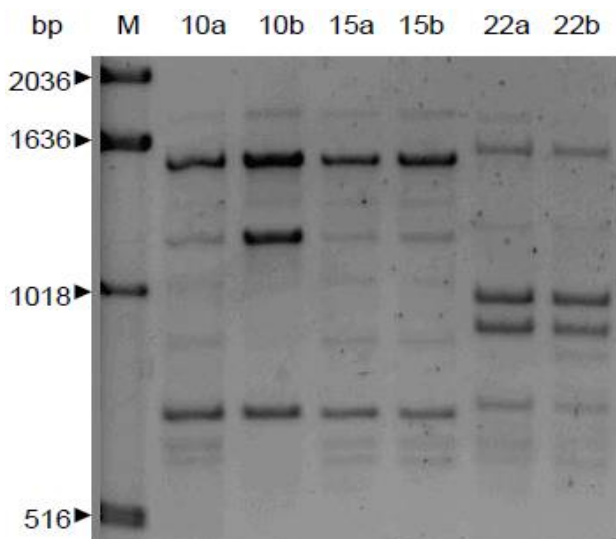
Weiterhin fiel auf, dass Patient 18 mit dem gleichen RAPD-Genotyp 3 wie die Patienten 10 und 15 besiedelt war. Es handelte sich hier um einen Genotyp, der sowohl gegen Tobramycin resistente als auch sensible Varianten aufwies. Bei Patient 18 wurde der Stamm bereits im Jahr 1993 isoliert. Die Patienten 10 und 15 akquirierten den Stamm erst im Jahr 1998 nach einem Kontakt mit Patient 18. Es ist unklar, wo Patient 22 den resistenten PA-Stamm erworben hat.

Abbildung 21, 22. Genotypischer Vergleich von *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolaten der Patienten 2 und 18 (Abb. 21) sowie 6 und 21 (Abb. 22) mittels RAPD-Analyse



bp: Basenpaare, M: Marker; PA-Isolate: 6a, 6b, 21a, 21b und 2a, 2b, 18a, 18b, 18c, 18d

Abbildung 23. Genotypischer Vergleich von *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolaten der Patienten 10, 15 und 22 mittels RAPD Analyse (Verwendung von Primer 272)



bp: Basenpaare, M: Marker; PA-Isolate: 10a, 10b, 15a, 15b, 22a, 22b.

5. Diskussion

Der häufigste und für Verlauf und Prognose wichtigste Infektionserreger bei Mukoviszidose ist *P. aeruginosa* (PA) [73]. Trotz stark inflammatorischer Abwehrreaktionen und aggressiver antibiotischer Therapie persistiert PA in den Atemwegen von Patienten mit CF, führt zu chronischen Infektionen und nach 20 bis 30 Jahren zur respiratorischen Insuffizienz [8].

Die Kolonisation oder Infektion mit PA erfolgt im frühen Kindesalter. Durch regelmäßiges Screening auf PA soll die Erstbesiedlung möglichst rasch erfasst und eine Eradikationstherapie eingeleitet werden [24, 25] mit dem Ziel, die planktonischen Stämme abzutöten und die Biofilmbildung zu verhindern oder hinauszuzögern [22, 23, 26].

Gelingt dies nicht, bleiben die Patienten chronisch mit PA kolonisiert bzw. infiziert [25, 26]. Ab dem 6. Lebensjahr wird versucht, mit einer lebenslangen Suppressionstherapie die hohen Keimzahlen von PA von 10^7 - 10^9 KBE/g um 3 - 5 \log_{10} -Stufen im Sputum zu reduzieren [74, 75]. Die Effektivität der Suppressionstherapie gilt hinsichtlich der Verbesserung wichtiger Symptome wie Abnahme der Sputummenge, der Sputumpurulenz sowie der Reduktion der PA-Keimzahl im Sputum, Gewichtszunahme, Abnahme der Exazerbationen, Verbesserung der Lungenfunktion, verzögerter Funktionsverlust der Lunge als gesichert [76, 77, 78, 79].

Die lebenslange Anwendung von Antibiotika birgt das Risiko der Resistenzentwicklung. Die Arbeit befasst sich mit der Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin und Colistin unter langjähriger inhalativer Suppressionstherapie bei Patienten mit CF. Resistenzdaten bei Langzeitbeobachtung sind selten untersucht und existieren in Deutschland nicht.

5.1 Patienten

In die retrospektive Studie wurden alle Patienten des Christiane Herzog - Zentrums für Mukoviszidose der Universität Würzburg eingeschlossen, die im Studienzeitraum von 1989 bis 2009 chronisch mit PA besiedelt waren und infolgedessen eine langdauernde Suppressionstherapie erhalten hatten (10 Frauen und 12 Männer) (Tabelle 6).

5.1.1 Diagnosestellung und Erstnachweis von *P. aeruginosa*

Die Diagnosestellung Mukoviszidose lag bei durchschnittlich 9,4 Jahren (arithmetischer Mittelwert) (Tabelle 6), der Erstnachweis von PA erfolgte im Durchschnittsalter von 12,5 Jahren (Tabelle 7). Der Erstnachweis mit 12,5 Jahren ist im Vergleich mit der Literatur [11] spät. Aufgrund der heutigen Datenlage geht man davon aus, dass die Erstbesiedlung schon im ersten Lebensjahr bzw. in einem Durchschnittsalter von 21 bis 23 Monaten erfolgt [11].

Die heute frühere Diagnosestellung der Mukoviszidose und der frühere Erstnachweis von PA sind dadurch zu erklären, dass über die Mukoviszidose in der Bevölkerung genauere Kenntnisse vorhanden sind als bei der Geburt der Studienpatienten in den Jahren 1968 bis 1993. Die stetige Aufklärung durch die CF-Gremien hat heute sogar schon bei Neugeborenen zu Screening-Untersuchungen auf Mukoviszidose geführt, so dass die Erkrankung frühzeitig diagnostiziert werden kann und präventive Maßnahmen ergriffen werden können. In den 1980-iger Jahren wurde die Diagnose Mukoviszidose vorwiegend aufgrund klinischer Hinweise gestellt. Der Krankheitsverlauf ist aber in Abhängigkeit von dem Gendefekt sehr unterschiedlich. Bei Verläufen mit schwerer Krankheitsausprägung und Beteiligung mehrerer Organsysteme gingen die Patienten frühzeitig zum Arzt, und die Diagnose wurde frühzeitig gestellt. Bei Verläufen mit einer milden, spät einsetzenden klinischen Symptomatik erfolgten der Arztbesuch und die damit verbundene Diagnosestellung später, bei manchen Patienten erst im Schulkindesalter oder noch später. Die genannten Faktoren können das höhere Lebensalter bei der Diagnosestellung und den damit verbundenen späten Erstnachweis von PA in der vorliegenden Studie erklären. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Ballmann und Mitarbeitern aus dem Jahr 1998 [58], nach denen der Erstnachweis von PA bei den Patienten im Durchschnittsalter von 10,5 Jahren erfolgte und die chronische Besiedlung mit 11,7 Jahren auftrat. Generell wird die Diagnose der Mukoviszidose, wenn sie aufgrund klinischer Hinweise erhoben wird, später als bei Screening-Untersuchungen gestellt. Das bestätigt die Beobachtung, dass

selbst im Jahr 2013 in Deutschland die Diagnose der CF aufgrund klinischer Hinweise nur bei 59% der Patienten im ersten Lebensjahr gestellt wurde [80].

5.1.2 Eradikationstherapie

Die Eradikationstherapie wird nach der aktuellen deutschen S3-Leitlinie [25], wie in Kapitel 1.1.6.1 beschrieben, durchgeführt. Ihre Effektivität wird im Hinblick auf die verzögerte Entwicklung einer chronischen PA-Infektion von vielen Autoren aufgezeigt [23, 81, 82, 83, 84]. In der vorliegenden Studie gelang die Eradikationstherapie nur bei 9 Patienten (40,9%). In den Untersuchungen von Ratjen und Mitarbeitern [64] lag die Rate der erfolgreichen Keimeradikation am Studienende bei über 90% und 27 Monate später bei 70%.

Die Keimeradikation bei nur 40,9% der Patienten erklärt sich dadurch, dass eine große Zahl von Studienpatienten (54,5%) schon bei der Diagnose bzw. Erstvorstellung chronisch mit PA besiedelt war. Das gilt besonders für Patienten, die über Hausärzte in das Christiane Herzog - Zentrum kamen. Zum Studienzeitpunkt waren seit der Einführung der Eradikationstherapie in dänischen CF-Zentren erst wenige Jahre vergangen, so dass sich die Methode noch nicht in Deutschland durchgesetzt hatte, in den damaligen deutschen Leitlinien nicht empfohlen und infolgedessen auch in den meisten deutschen CF-Zentren nicht eingesetzt wurde; d. h. diese Patienten wurden nach Akquirieren von PA schnell chronisch besiedelt und erhielten in der Regel sofort nach Diagnosestellung eine Suppressionstherapie.

5.1.3 Suppressionstherapie

Bei Compliance bestand die Suppressionstherapie aus 4 Zyklen einer 14-tägigen parenteralen Applikation von PA-wirksamen Antibiotika und einer Inhalationstherapie mit Colistin oder Tobramycin im Intervall. Dieses Vorgehen steht im Einklang mit der Literatur [25].

5.1.4 Inhalationstherapie

Der Erfolg der Inhalationstherapie ist auf die hohen Antibiotikakonzentrationen im Endotrachealraum zurückzuführen. Die Konzentration nach Inhalation mit 2 x

täglich 300 mg Tobramycin liegt bei etwa 700 - 1980 µg/g Sputum [85, 86, 87, 88]; das ist wesentlich höher, als es die MHK-Werte von Tobramycin gegen PA sind. Demgegenüber liegt die Konzentration von Tobramycin nach parenteraler Gabe im Serum bei 2 - 5,6 µg/mL und im Sputum aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit bei nur 0,7 - 1 µg/g Sputum [85, 89, 90].

Auch nach Colistin-Inhalation werden im Endotrachealsystem hohe Konzentrationen erreicht. Ratjen und Mitarbeiter [91] bestimmten nach Inhalation von 2 Mio IE Colistin (66 mg Colistin oder 158 mg Colistimethat-Na) die Colistin-Konzentration im Sputum nach 1 h, 4 h und 12 h. Diese war nach 1 h am höchsten und lag 100-mal höher als die MHK von Colistin gegen PA. Nach 12 h lag die Colistinkonzentration im Sputum immer noch bei über 4 µg/g.

Aufgrund der guten Ergebnisse hat die Inhalationstherapie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung zur Keimelimination oder -reduktion bei PA-besiedelten Patienten mit CF gewonnen. Die Regime reduzieren die Anzahl von pulmonalen Exazerbationen sowie die Notwendigkeit der intravenösen Therapie, ferner wird der Verlust der Lungenfunktion verzögert. Zu den unerwünschten Wirkungen gehört die Resistenzentwicklung gegen die applizierten parenteralen und inhalativ angewandten Antibiotika [92].

5.2. Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*

5.2.1 Besiedlungsrate

Über den Untersuchungszeitraum von 1989 bis 2009 wurden bei 22 Studienpatienten 1.844 PA-Stämme isoliert; davon waren 513 mukoid (27,8%) und 1.331 (72,2%) nicht-mukoid; mukoide Stämme konnten bei 16 (72,7%) Patienten nachgewiesen werden (Tabelle 8).

5.2.2 Phänotypen von *Pseudomonas aeruginosa*

PA-Isolate weisen, wie von anderen Autoren aufgezeigt [40, 93], eine große phänotypische Vielfalt auf. In dieser Arbeit kann aufgrund der vom IHM zur Verfügung gestellten Daten nur zwischen mukoiden und nicht-mukoiden Stämmen unterschieden werden.

5.2.2.1 Nicht-mukoide Stämme

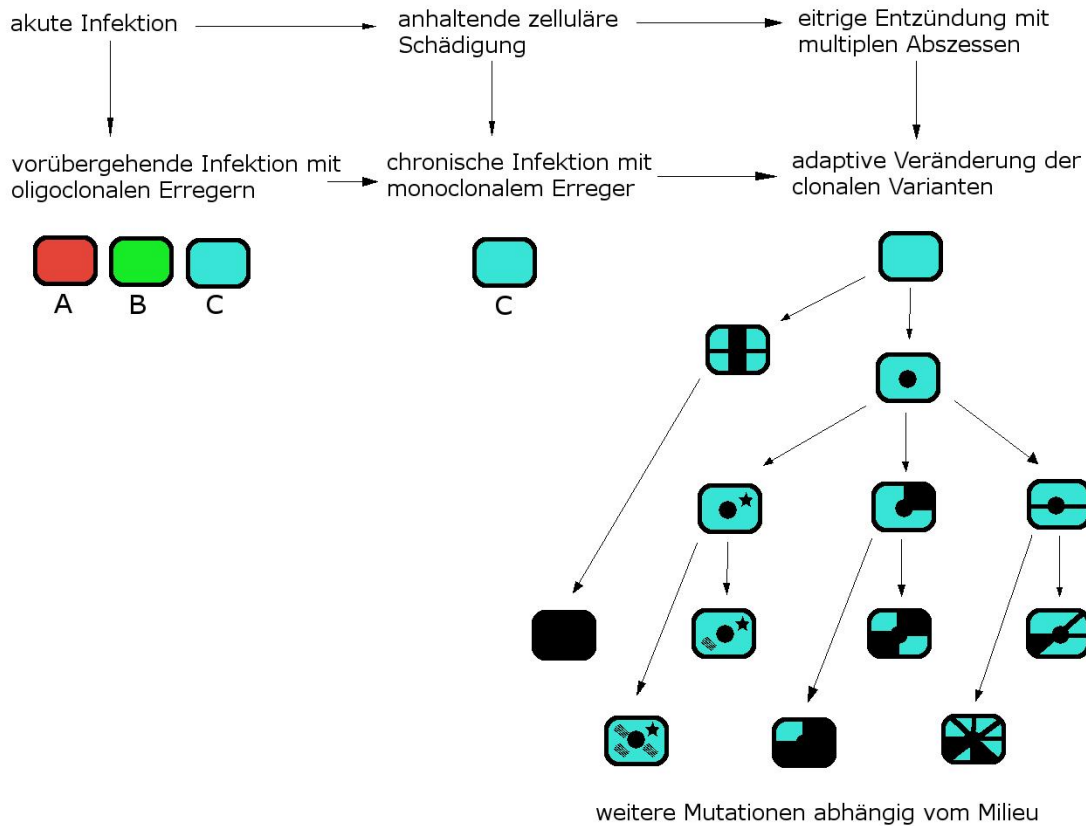
Die früh im Krankheitsverlauf angezüchteten Bakterien waren nicht-mukoid und nicht resistent gegen PA-wirksame Antibiotika. Mit zunehmender Besiedlungsdauer wurden die Stämme resistenter gegen alle Antibiotikaklassen. Das ist nicht zuletzt auf die häufige antibiotische Therapie und die damit verbundene sekundäre Resistenzentwicklung oder Selektion bei chronischer Besiedlung zurückzuführen [76, 93].

Aus einer Sputumprobe ließen sich bei den chronisch besiedelten Patienten bis zu 4 Isolate nachweisen, die in der Empfindlichkeit gegen Antibiotika beträchtlich variierten und sich durch die Antibiotikatherapie während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht mehr eradizieren ließen.

Dies stimmt mit der Literatur überein. Bei Emerson und Mitarbeitern [94] wurden in einer Studie pro Patient 2,6 Morphotypen, bei Burns und Mitarbeitern 2,38 Morphotypen aus einer Sputumprobe isoliert [95]. In einer Studie von Clark und Mitarbeitern [96] konnten von einer 34-jährigen Patientin innerhalb eines Jahres bis zu 34 verschiedene Phänotypen nachgewiesen werden. Mayer-Hamblett und Mitarbeiter [97] isolierten aus den Sputa von 192 Patienten zwei Phänotypen, die mit einem ausgeprägten Eradikationsversagen assoziiert waren. Auch Manos und Kollegen [98] fanden bei der Untersuchung von 92 Isolaten neugeborener Kinder persistierende PA-Stämme.

Die Vielfalt der PA-Isolate [15, 95, 96], erklärt sich dadurch, dass die initial erworbenen Genotypen im weiteren Verlauf der Mukoviszidose sich im ständig wechselnden Habitat der Lunge adaptieren und in verschiedenste Morphotypen umwandeln (z. B. mukoide Stämme mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung, small colony variants (SCVs) und resistente Hypermutatoren) (Abbildung 24). Sie passen sich dem Stress in der Lunge an, der durch die Inflammationsreaktion und antibiotische Therapie entsteht [93]. Diese Stämme können mit Hilfe der in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Pathomechanismen chronische Infektionen unterhalten. PA verliert z. B. einige Virulenzfaktoren, verlangsamt die Wachstumsrate, vergrößert die Antibiotika-Resistenz und/oder reduziert die Stimulation des Immunsystems [99].

Abbildung 24. Adaption von PA in den Atemwegen bei Patienten mit CF



modifiziert nach Hogardt und Heeseemann 2010 [93]

5.2.2.2 Mukoide Stämme

Der Nachweis mukoider Stämme erfolgte erstmals im Durchschnittsalter (arithmetischer Mittelwert) von 17,2 Jahren. Die Umwandlung in mukoiden Phänotypen dauerte im Durchschnitt 6,0 Jahre nach Erstnachweis (Tabelle 9). Der Zeitpunkt bis zum Auftreten mukoider Isolate stimmt mit den Angaben in der Literatur überein. Li und Mitarbeiter [100] fanden bei Erstbesiedlung ebenfalls nur nicht-mukoiden Stämme, mukoiden Stämme traten erst zwischen dem 4. und 16. Lebensjahr auf. Die Umwandlung von nicht-mukoiden in mukoiden Stämme dauerte im Durchschnitt 10,9 Jahre, wobei ein langes Intervall, wie in der vorliegenden Studie, bei Patienten auftrat, die weniger oft systemisch mit Antibiotika behandelt wurden. Bei Ballmann und Kollegen [58] lag das Durchschnittsalter bis zum Auftreten mukoider Stämme bei 12,5 Jahren.

In der vorliegenden Studie wiesen die mukoiden Stämme *in vitro* eine größere Sensitivität gegen Tobramycin auf als die nicht-mukoiden. Das erscheint ungewöhnlich, da von den meisten Autoren, wenn auch nicht von allen [60, 101], mukoide Stämme aufgrund der Biofilmbildung als resistenter beschrieben werden. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie stehen die Ergebnisse von Valenza und Mitarbeitern [102]. Die Autoren untersuchten von 2008 bis 2009 im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg 271 Sputa von 60 Patienten mit CF. Von 172 Isolaten waren 6,6% mukoid, und 65,5% der mukoiden Stämme waren Tobramycin-sensibel.

5.2.3 Genotypen (Klone) von *Pseudomonas aeruginosa*

Die phänotypische Vielfalt der PA-Isolate legt den Schluss nahe, dass Patienten mit CF mit verschiedenen Genotypen (Klonen) besiedelt sind. Dies konnte in molekulargenetischen Studien widerlegt werden.

Nach zahlreichen Angaben in der Literatur sind Patienten mit CF nur mit einem Genotyp (selten mit mehreren Genotypen) besiedelt [40, 103, 104, 105]. Gleiche Genotypen bei verschiedenen Patienten deuten auf eine Übertragung oder eine gemeinsame Infektionsquelle hin.

Zur Abklärung dieser Frage wurden stichprobenartig einige PA-Isolate verschiedener Patienten im IHM molekulargenetisch untersucht und die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe der RAPD-Analyse konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Patienten mit verschiedenen, individuellen Genotypen besiedelt sind. Darüber hinaus war ersichtlich, dass jeder Patient über den gesamten Beobachtungszeitraum lediglich mit einem Genotyp besiedelt war (Tabelle 16), auch wenn sich die Stämme phänotypisch (mukoid, nicht-mukoid) und in der Sensitivität (Tobramycin-resistent, Tobramycin-sensibel) unterschieden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. Cramer und Mitarbeiter genotypisierten in Hannover die Stämme von 35 Patienten mit CF, die über einen Zeitraum von 30 Jahren isoliert worden waren. Von 35 Patienten verloren 3 Patienten ihren initial akquirierten PA-Genotyp nach 6 bis 75 Monaten, die übrigen 32 Patienten blieben mit dem initial erworbenen PA-Genotyp chronisch besiedelt [106]. In der Studie von Wolz [103]

waren 70,9% der Patienten mit einem Genotyp besiedelt. In einer weiteren Studie von Speert [107] zeigten 78,3% der Patienten verschiedene Genotypen.

5.3 Empfindlichkeitsprüfung von *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.1 Tobramycin

Die Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Tobramycin ist unproblematisch. Sie kann nach den Regelwerken (NCCLS, CLSI, EUCAST) mittels Agardiffusion, MHK-Bestimmung (Mikrodilution oder Etest®) oder mit mechanisierten Verfahren, wie Vitek 2, korrekt und zuverlässig durchgeführt werden.

5.3.2 Colistin

Die Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung von Colistin ist aus verschiedenen Gründen problematisch.

Die Agardiffusion ist nach dem Regelwerk der NCCLS/CLSI [68, 69] und nach der MiQ 24 [19] unzulässig, weil Colistin schlecht in den Agar diffundiert und infolgedessen keine zuverlässigen Hemmhöfe ablesbar sind. Folglich muss die Sensitivität von PA gegen Colistin mittels MHK-Bestimmung ermittelt werden. Zur MHK-Bestimmung standen während des Studienverlaufs (1989 - 2009) im Institut für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) für Routineuntersuchungen die Mikrodilution in Mikrotiterplatten und der Gradientendiffusionstest, kurz Etest® genannt, zur Verfügung. Der Etest® war zu dieser Zeit ein gängiges und in der Literatur gut beurteiltes Verfahren [70, 71] zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien. Die Erfahrung zur Testung von PA gegen Colistin mit dem Etest® war allerdings begrenzt. Nach MiQ 24 [19], die 2006 veröffentlicht wurde, konnten die Autoren die Ergebnisse des Etests® bei der Testung von PA gegen Colistin noch nicht endgültig beurteilen. In neuerer Zeit wurden Studien durchgeführt mit dem Ziel, die Zuverlässigkeit der Empfindlichkeitsprüfung gegen Colistin mit Etest® und Vitek 2 im Vergleich zum goldenen Standard der Mikrodilution zu überprüfen [108, 109, 110, 111]. Die Autoren kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen; im Vergleich mit der Mikrodilution waren die ermittelten MHK-Werte zu hoch (falsch resistent), vergleichbar oder zu niedrig (falsch sensibel). Ab 2017 müssen nach

dem Regelwerk der EUCAST [112] die MHK-Werte für Colistin mit der Mikrodilution bestimmt werden.

Die geschilderte Problematik spielt allerdings für die vorliegende Studie keine Rolle. Wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben, wurde die routinemäßige Empfindlichkeitsprüfung von PA gegen Colistin am IHM über den gesamten Studienverlauf nach NCCLS/CLSI [68, 69], wie vorgeschrieben, nicht mittels Agardiffusion, sondern mit der MHK-Bestimmung durchgeführt. Diese erfolgte von 2000 bis 2005 mittels Mikrodilution (Goldstandard). Ab 2006 erfolgte die MHK-Bestimmung mittels Vitek 2 (Breakpointmethode) und mit dem Etest®. Aufgrund der Hinweise in der MiQ 24 [19] wurden diskrepante oder für die Patienten ungewöhnliche oder unplausible Ergebnisse mittels Mikrodilution überprüft, so dass die Resistenzbestimmung von PA gegen Colistin während des gesamten Beobachtungszeitraums in der Routine leitliniengerecht und auch nach den heute geltenden Kriterien zuverlässig durchgeführt wurde.

Die Überprüfung der Validität der routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfung von PA erfolgte durch Dr. Valenza (IHM) vor Studienbeginn im Jahr 2009 mit dem Etest®. Es konnten keine Diskrepanzen beobachtet werden. Zusammengefasst kann also davon ausgegangen werden, dass die an das Christiane Herzog - Zentrum übermittelten Werte für die Sensitivität von Tobramycin und Colistin valide und daher für die retrospektive Analyse geeignet sind.

Ein weiteres Problem ergab sich bei der Bewertung der ermittelten Colistin-MHK-Werte. EUCAST verfügte erst ab 2010 über MHK-Grenzwerte für Colistin [112]. Für MHK-Bestimmungen in Europa wurden daher entweder, wie im IHM, die amerikanischen Regelwerke der NCCLS/CLSI oder nationale Regelwerke benutzt. Während die Grenzwerte für Tobramycin einheitlich waren, waren sie für Colistin sehr unterschiedlich (Tabelle 18). Daraus folgt, dass die in der Literatur beschriebenen Resistenzen für Colistin je nach Verwendung der Regelwerke variieren können. Das musste in den hier zitierten Studien bei der Bewertung der Colistin-Resistenz berücksichtigt werden. Die meisten Studien verwendeten

jedoch die Grenzwerte des Regelwerks der NCCLS/CLSI und gingen, wie auch das IHM, von einer Sensitivität für Colistin von $S = \leq 2 \mu\text{g/mL}$ aus.

Tabelle 18. Grenzwerte (MHK) für Colistin nach den nationalen Regelwerken

Land	S	I	R
Deutschland (DIN)	$\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$	1 - 2 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$
Großbritannien (BSAC)	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	----	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Frankreich (FSM)	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	----	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$
USA (NCCLS, CLSI)	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Europa (EUCAST 2017)	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	---	$> 2 \mu\text{g/mL}$

S = sensibel, I = intermediär sensibel, R = resistent

5.4 Resistenzentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa*

5.4.1 Inhalationstherapie

In der vorliegenden Studie traten trotz des hohen Einsatzes von Colistin (4.404 Wochen) keine Resistenzen gegen Colistin auf (Tabelle 11, 14).

Im Gegensatz dazu waren 30,4% der PA-Isolate am Studienende resistent gegen Tobramycin, und es entwickelten sich trotz des geringeren Einsatzes (1.736 Wochen) kontinuierliche Tobramycin-Resistenzen bei 31,8% der Patienten, bei 81,8% handelte es sich um eine low level Resistenz (LLR) mit MHK-Werten von $\leq 128 \mu\text{g/mL}$. Auch in der Literatur sind in der Mehrzahl bei Patienten mit Mukoviszidose LLR-Stämme beschrieben [94, 113].

5.4.1.1 Resistenzentwicklung gegen Tobramycin

Emerson und Mitarbeiter [94] untersuchten im Jahr 2008 Sputa von 267 Patienten mit CF aus 33 Zentren, die eine Inhalationstherapie mit Tobramycin erhielten. Es wurden 656 Isolate mit PA-Isolaten aus dem Jahr 1995 verglichen (NCCLS-/CLSI-Werte), die aus Sputa von 508 Patienten aus 69 CF-Zentren gewonnen worden waren (1.240 Isolate). Die Tobramycinresistenz stieg von 11,8% im Jahr 1995 auf 30,4% im Jahr 2008 an; 6,6% der resistenten Stämme wiesen 2008 eine HLR auf, im Jahr 1995 waren es nur 0,24% der Stämme.

Burns und Mitarbeiter [114] führten von Juli 1995 bis Oktober 1996 eine placebokontrollierte Studie an 69 CF-Zentren durch. Eingeschlossen waren 262

Kontrollpatienten und 258 intermittierend besiedelte Patienten, die eine Inhalationstherapie mit Tobramycin erhielten. Die Sputa wurden vor Therapiebeginn sowie nach 24 Wochen auf PA untersucht. Vor Therapiebeginn wiesen 13% der Studienpatienten und 10% der Kontrollen Tobramycin-resistente PA-Stämme auf (NCCLS-Werte), am Studiende konnten bei 23% der Studienpatienten und bei 8% der Kontrollpatienten Tobramycin-resistente Pseudomonaden nachgewiesen werden.

Moss und Kollegen [113] untersuchten in einer randomisierten Studie den Effekt der Tobramycin-Inhalationstherapie bei 128 chronisch besiedelten Patienten aus 96 Zentren. Die Sputa wurden nach 20 und nach 96 Wochen auf PA untersucht. Die Resistenzrate (NCCLS-Werte) der isolierten Stämme stieg nach 96 Wochen von 5% auf 19% an, die Zahl der Patienten mit resistenten PA-Stämmen erhöhte sich von 10% auf 41%. Die klinische Erfolgsrate blieb bei LLR-Stämmen (MHK-Werte $\leq 128 \mu\text{g/mL}$) unbeeinflusst von der Tobramycin-MHK, d. h. auch Patienten mit Tobramycin-resistenten Stämmen zeigten einen positiven klinischen Effekt einer Tobramycin-Inhalation. Der Grund dafür ist, dass nach Inhalation die Tobramycin-Konzentration im Endobronchialraum bei etwa $1200 \mu\text{g/g}$ Sputum liegt [68] und damit Stämme mit einer MHK von 8 - $64 \mu\text{g/mL}$ noch therapeutisch erfasst werden.

Raidt und Mitarbeiter [17] untersuchten in den Jahren 2001 und 2011 in Münster die Antibiotika-Empfindlichkeit von 511 PA-Isolaten von 94 Patienten mit CF aus zwei Zentren. Im Jahr 2001 wurden 184 PA-Stämme (136 nicht-mukoide und 48 mukoide) untersucht, im Jahr 2011 waren es 327 Stämme (209 nicht-mukoide und 118 mukoide), die ausgetestet wurden. Im Jahr 2001 lag die Resistenzrate gegen Tobramycin bei 8,1% (nicht-mukoide Stämme) und 4,2% (mukoide Stämme). Im Jahr 2011 waren 52,6% der nicht-mukoiden Stämme und 36,4% der mukoiden Stämme resistent gegen Tobramycin.

5.4.1.2 Resistenzentwicklung gegen Colistin

In der o. g. Studie von Raidt [17] trat bei den mukoiden PA-Stämmen keine Colistinresistenz auf, während die Resistenzrate der nicht-mukoiden PA-Stämme von 1,5% im Jahr 2001 auf 11,3% im Jahr 2011 anstieg.

In einer deutschen, prospektiven, randomisierten, nicht verblindeten Studie von Schuster und Mitarbeitern [77] wurde die Wirksamkeit der Inhalationstherapie mit Colistin (3 x 1 Mio IE) in einem Zeitraum über 24 Wochen bei chronisch besiedelten Patienten mit CF untersucht. Eingeschlossen wurden 187 Patienten aus 66 CF-Zentren Europas. Nach 24 Wochen lag die Colistin-Resistenz bei $\leq 1,1\%$.

Im Jahr 2007 untersuchten Haase und Mitarbeiter (persönliche Mitteilung) 129 PA-Isolate (das erste und letzte Isolat bei einem Patienten) von chronisch besiedelten Patienten der CF-Ambulanz in Aachen. Die Colistin-Resistenz betrug nur 0,8% (CLSI-Werte).

In einer Veröffentlichung von Jensen und Kollegen [115] wurde in einer prospektiven, doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Studie die Effektivität der Colistin-Inhalationstherapie bei chronisch besiedelten Patienten mit CF untersucht. Es wurden 20 Kontrollen und 20 Studienpatienten, die 3 x 1 Mio IE Colistin erhielten, eingeschlossen. Nach 60 Tagen wurden keine Resistenzen gegen Colistin beobachtet.

Hansen und Mitarbeiter [63] untersuchten im Zeitraum von 1989 bis 2003 in einer retrospektiven Kohortenstudie die Resistenzentwicklung von Colistin unter Suppressionstherapie (tägliche Inhalation mit 3 x 2 Mio IE). Es wurden 146 Patienten mit intermittierender und 12 Patienten mit chronischer PA-Besiedlung in die Studie eingeschlossen. Insgesamt wurden 1.093 PA-Stämme (946 nicht mukoide, 147 mukoide Stämme) untersucht; es konnten über den gesamten Zeitraum keine Resistenzen gegen Colistin nachgewiesen werden (CLSI-Werte).

Jansen und Kollegen [105] untersuchten im Jahr 2014 in einer Rehabilitationsklinik für Patienten mit CF auf der Insel Amrum 45 PA-Isolate von 13 Patienten mit CF, die kontinuierlich eine Inhalationstherapie mit Colistin erhalten hatten. Nur ein Isolat (2,2%) von 45 Isolaten wies eine Colistin-Resistenz auf.

Hogard und Mitarbeiter [116] überprüften in den Jahren 2000 bis 2002 die Empfindlichkeit der PA-Isolate gegen Colistin der Patienten, die in der CF-Ambulanz in München eine Inhalationstherapie mit Colistin erhalten hatten. Es wurden 401 Stämme (220 nicht-mukoid, 181 mukoid) von chronisch besiedelten

Patienten, die durchschnittlich 3-mal im Jahr die Ambulanz aufgesucht hatten, untersucht. Resistente Stämme konnten bei 13,5% der Patienten beobachtet werden. Die Resistenzrate der Isolate gegen Colistin lag bei 6,8% (NCCLS-Werte).

Schülin und Mitarbeiter [101] testeten die Empfindlichkeit von 229 nicht-mukoiden und 156 mukoiden PA-Isolaten aus 192 Sputa von 57 chronisch besiedelten Patienten mit CF gegen Colistin. Von den nicht-mukoiden Isolaten waren 34,9% gegen Colistin sensibel, 49,8% intermediär sensibel und 15,3% resistent; von den mukoiden Stämmen waren 51,9% sensibel, 44,9% intermediär sensibel und 3,2% resistent. Es wurden die Grenzwerte der DIN aus dem Jahr 2000 angewandt ($S = \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$, $I = 1 - 2 \mu\text{g/mL}$, $R = \geq 4 \mu\text{g/mL}$), die aus heutiger Sicht zu niedrig sind. Bei Verwendung der Grenzwerte des CLSI-Regelwerks mit einem Sensitivitäts-Breakpoint von $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ wären 10,9% der Stämme Colistin-resistent.

Zusammengefasst ist die in der Literatur beschriebene Resistenzentwicklung von PA gegenüber Colistin nach Inhalation gering oder, wie in der vorliegenden Studie, nicht vorhanden. Dagegen führt die Inhalation mit Tobramycin je nach der Dauer der Suppressionstherapie zur Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin; das steht mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ebenfalls im Einklang. Allerdings war der Beobachtungszeitraum in der Literatur nur in Ausnahmefällen länger als 2 Jahre. Patienten-bezogene Langzeitbeobachtungen über viele Jahre lagen nicht vor, so dass die Ergebnisse nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar sind.

5.4.2 Parenterale Tobramycin-Therapie

Die parenterale Tobramycin-Therapie scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Tobramycin-Resistenz zu haben. In allen drei Patientengruppen war die durchschnittliche parenterale Tobramycin-Applikation über den Studienzeitraum etwa gleich groß (20,3 bis 21,8 Zyklen) (Tabelle 14). Bei Betrachtung der Tobramycingabe und des Zeitpunktes der Resistenzentwicklung unter der parenteralen Tobramycintherapie erhielten die mit hohen Resistenzraten

besiedelten Patienten weniger Tobramycin-Zyklen pro Patient als die mit geringen Resistenzraten besiedelten Patienten (Tabelle 14). Bei einem negativen Einfluss der parenteralen Tobramycintherapie auf die Resistenzentwicklung wäre bei der Applikation von mehr Zyklen Tobramycin mit einer höheren Resistenzrate zu rechnen als bei der Applikation weniger Zyklen und nicht umgekehrt.

Dies kann am Ehesten damit erklärt werden, dass parenteral appliziertes Tobramycin nicht an den Ort der Infektion penetrieren und dort keine wirksamen Spiegel aufbauen kann. Wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, wird der Endotrachealbaum mit parenteral appliziertem Tobramycin schlecht oder nicht erreicht. Auch die Penetration von Tobramycin nach parenteraler Gabe ins Lungengewebe ist schlecht, schon bei nicht entzündetem Gewebe. Bei Entzündung wird darüber hinaus durch den niedrigen pH-Wert und die gramnegative Ladung des entzündeten Gewebes die Wirkung des positiv geladenen Tobramycins zusätzlich herabgesetzt, so dass in beiden Kompartimenten, Lungengewebe und Endotrachealbaum, nicht mit einer signifikanten Antibiotika-Konzentration bzw. -Wirkung gerechnet werden kann. Somit können sich keine Resistenzen gegen eine Substanz entwickeln, die in dem Kompartiment, wo eine Resistenzentwicklung stattfinden kann, gar nicht vorhanden ist.

5.5 Einflüsse auf die Tobramycin-Resistenzentwicklung unter Suppressionstherapie

Nach dem Vergleich mit dem Permutationstest ergab sich eine Signifikanz für die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin (unkorrigierter p-Wert $<0,05$) (Tabellen 14, 15) für die folgenden Parameter (Risiko-Parameter): Erstens die frühe Erstbesiedlung mit PA, zweitens der frühe Beginn der Suppressionstherapie und deren lange Dauer bis hin zum Erwachsenenalter und drittens die vorwiegend mit Tobramycin durchgeführte Inhalationstherapie über einen langen Zeitraum.

Aufgrund der großen Anzahl an Tests wurden diese p-Werte nach der Methode von Bonferroni für multiples Testen korrigiert. Nach der Korrektur ergab sich keine Signifikanz, was aufgrund der kleinen Patientenzahl zu erwarten war

(Tabelle 15). Das heißt aber nicht, dass die o. g. Risiko-Parameter keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin haben, sondern nur, dass dieser nicht signifikant nachgewiesen werden kann und die Unterschiede zwischen den Gruppen möglicherweise nur auf Zufall und nicht auf einem systematischen Effekt beruhen. Es muss jedoch gesagt werden, dass aufgrund der kleinen Stichproben diese Tests wenig Aussagekraft haben und somit keine klare und eindeutige Aussage über die statistische Signifikanz getroffen werden kann.

Beim Vergleich der p-Werte aller untersuchten Parameter sind die unkorrigierten signifikanten p-Werte der Risiko-Parameter doch auffällig kleiner als die p-Werte der Nicht-Risiko-Parameter (Tabelle 15), so dass ein Effekt dieser Risiko-Parameter auf die Resistenzentwicklung von PA gegen Tobramycin nicht völlig ausgeschlossen scheint und die im Permutationstest erhaltenen Signifikanzen explorativ bewertet werden können. Mit größerer Fallzahl könnte in einer Folgeuntersuchung möglicherweise ein Einfluss der Risiko-Parameter auf die Resistenzentwicklung nachgewiesen werden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass nach langer Anwendung von Antibiotika das Risiko für die Resistenzentwicklung ansteigt. Insgesamt ist aufgrund der geringen Stichproben eine statistische Auswertung der Ergebnisse als kritisch zu werten.

5.6 Übertragung von resistenten *Pseudomonas-aeruginosa*-Stämmen

In der vorliegenden Studie konnte die Übertragung eines resistenten PA-Stamms von einem Patienten (Patient 18) auf zwei Patienten (Patient 10 und 15) mit hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. In diesem Fall besuchten alle drei Patienten zeitgleich im Jahr 1998 dasselbe Camp. Der Nachweis gleicher Genotypen erfolgte durch Dr. Valenza molekulargenetisch mittels der RAPD-Analyse. Bei allen drei Patienten handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Besiedlung mit dem gleichen Stamm (Genotyp 3). Übertragungen oder nosokomiale Transmissionen sind auch in der Literatur beobachtet worden [117, 118, 119].

In Australien ist die Übertragung eines multiresistenten Stamms beschrieben bei Kindern, die in derselben Klinik betreut wurden [117]. In Dänemark wurden zwei

Ausbrüche Colistin-resistenter PA-Stämme im Zusammenhang mit einer Inhalationsbehandlung beschrieben [118]. Weiterhin wurde PA auf fünf bislang unbesiedelte Patienten in einem Wintercamp übertragen. Die Stämme wurden mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese als identisch identifiziert [119].

Die Übertragung erfolgt von Patient zu Patient über Tröpfchen [120] oder indirekt über Gegenstände und Hände [121], die mit den Sekreten der Patienten mit CF kontaminiert sind. Beim Vorhalten einer Agarplatte beim Husten von Patienten mit CF konnte in 65% der Fälle PA angezüchtet werden [120]. Bei den übertragenen PA-Stämmen handelt es sich häufig, wie in der vorliegenden Studie, um multiresistente Stämme oder um Stämme mit hoher Virulenz, deren Akquirierung häufig mit einer klinischen Verschlechterung und höherer Letalität einhergehen [122]. In den letzten Jahren wurden PA-Stämme mit einem hohen Übertragungspotential und erhöhter Morbidität wie der LES (Liverpool Epidemic Strain) beschrieben. Diese Stämme nehmen zu, sie können die initial erworbenen patienteneigenen Stämme ersetzen und zu einer zunehmenden Morbidität der Patienten mit CF beitragen [123].

5.7 Grenzen der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik

In der vorliegenden Studie war der Indexpatient (Patient 18), von dem die PA-Übertragung auf zwei weitere Patienten ausging, von Anfang an mit PA-Genotyp 3 besiedelt, der sich phänotypisch in verschiedenen Morphotypen manifestierte. Alle Stämme waren nicht-mukoid, aber mit verschiedener Antibiotika-Resistenz. Die MHK-Werte von Tobramycin schwankten von 1.5 - 4 µg/mL bis ≥ 256 µg/mL. Neben Stämmen mit einer LLR von 16 - 32 µg/mL wurden HLR-Stämme mit MHK-Werten von ≥ 256 µg/mL isoliert. Es gab auch Sputa dieses Patienten, in denen nur Tobramycin-sensible Stämme (MHK-Werte < 2 µg/mL) nachweisbar waren. Infolgedessen wurde der Patient nicht als Träger eines resistenten Stammes eingestuft und im Camp nicht von anderen Patienten getrennt. Im Gegensatz dazu traten bei den „Übertragungs-Patienten“ durchweg HLR-Stämme auf. Von einer Übertragung von Patient 18 wurde bis zum Erhalt des molekulargenetischen Ergebnisses nicht ausgegangen.

Dieser Fall zeigt die Grenzen der konventionell durchgeführten mikrobiologischen Diagnostik. Die MiQ 24 [19] fordert, alle verdächtigen PA-Isolate zu testen und nur das Antibiogramm des sensibelsten und des resistentesten Isolats auf dem Befund anzugeben. Das ist nur möglich bei phänotypisch verschiedenen Stämmen. Morphologisch gleich aussehende Stämme mit unterschiedlicher Empfindlichkeit (sensibel oder resistent) können in der Routinediagnostik selbst bei bester Umsetzung der MiQ 24 nicht zuverlässig getestet werden, da die resistenten Stämme makroskopisch nicht von den sensiblen unterschieden werden können und nur zufällig als resistent zu erkennen sind. Die Studie zeigt ferner, dass es nicht möglich ist, aufgrund unterschiedlicher Phänotypen auf verschiedene Genotypen (Klone) zu schließen.

5.8 Ausblick

Wie schon erwähnt, zeigt die Studie, dass die Resistenzentwicklung unter der Inhalation mit Colistin geringer ist als unter der Inhalation mit Tobramycin. Ob Colistin bei der Inhalationstherapie favorisiert werden soll, muss den behandelnden Ärzten überlassen werden. Da sich beide Antibiotika nach den Ergebnissen der im Jahr 2017 veröffentlichten Cochrane-Analyse [23] nicht in ihrer klinischen Wirksamkeit unterscheiden, hätte man aus mikrobiologischer Sicht bis vor wenigen Jahren empfohlen, die Anwendung von Colistin der von Tobramycin vorzuziehen. Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung gramnegativer Bakterien gegen Antibiotika, einschließlich Colistin, ist diese Empfehlung heute nicht mehr unproblematisch.

Bis zum Jahr 2015 wurden nur chromosomal kodierte Colistin-Resistenzen beobachtet. Diese Resistenzen können nicht ohne Weiteres von einer Bakterienspezies auf die andere oder von einem Bakteriengenus auf ein anderes übertragen werden. Auch die Übertragung von Patient zu Patient ist nicht so leicht möglich. Die Resistenzen entwickeln sich bei ausgeprägtem Mg^{2+} -Mangel, der *in vivo* beim Menschen nicht vorkommt, da nicht mit dem Leben vereinbar, oder bei subinhibitorischen Colistinkonzentrationen. Da Patienten mit CF überwiegend eine Inhalationstherapie mit Colistin bekommen, ist die Gefahr der subinhibitorischen Colistinkonzentration im Endotrachealraum gering und

dementsprechend das Risiko für eine Resistenzentwicklung klein. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie, die gezeigt haben, dass sich über einen Zeitraum von bis zu 10 Jahren selbst bei hohem Einsatz von Colistin zur Inhalation keine Resistenzen entwickelt haben.

Aufgrund des vermehrten Auftretens multiresistenter gramnegativer Bakterien (MRGN), die nur noch parenteral mit Colistin behandelbar sind, hat der parenterale Colistinverbrauch weltweit, auch in Deutschland, und in geringem Ausmaß auch bei Patienten mit CF, zugenommen. Bei der parenteralen Therapie können subinhibitorische Colistinkonzentrationen auftreten, welche die Resistenzentwicklung gegen Colistin induzieren können. Dazu kommt, dass seit 2015 erstmals in China Enterobacterales (*E. coli*, Klebsiellen, *Acinetobacter* spp. und *P. aeruginosa*) mit plasmidkodierten Colistin-Resistenzen isoliert worden sind. Es handelte sich dabei um Stämme mit einer LLR mit MHK-Werten von 4 - 8 µg/mL. Das verantwortliche Gen ist das *mcr-1*-Gen, das auch in sensiblen Stämmen nachgewiesen werden konnte [124]. Plasmid-kodierte Resistenzgene können leicht, auch von Patient zu Patient, übertragen werden. Man fand diese resistenten Stämme seit der Erstbeschreibung weltweit in der Umwelt, in Lebensmitteln, aber auch bei Patienten, auch in Deutschland [125]. Der parenterale Einsatz von Colistin, möglicherweise aber auch die Inhalationstherapie mit Colistin kann bei Patienten, die mit *mcr-1*-positiven Stämmen besiedelt sind, zu einer Selektion und Übertragung Colistin-resistenter Stämme führen. Daher sollte Colistin zurückhaltend und bei parenteraler Gabe nur nach sorgfältiger Empfindlichkeitsbestimmung (Mikrodilution) und, wenn möglich, nach Ausschluss des *mcr-1*-Gens eingesetzt werden.

Eine gute Alternative zur Inhalation mit Colistin wäre die Inhalation mit Aztreonamlysin, das seit 2010 zugelassen und im Handel ist. Die Substanz zeigt in aktuellen Studien eine gute Wirksamkeit in der Keimelimination. Im Vergleich mit der Tobramycin-Inhalation zeigte sich eine Überlegenheit in der Verbesserung der Lungenfunktion, ferner konnte die Zahl der Exazerbationen verringert werden [126]. In einer weiteren Vergleichsstudie mit einer Placebogruppe erwies sich Aztreonamlysin klinisch ebenfalls als sehr wirksam

[127]. Als weiteres Inhalations-Antibiotikum steht Levofloxacin-Lösung zur Verfügung, die ebenfalls eine gute Wirksamkeit zeigt [128].

Eine weitere Möglichkeit zur Prophylaxe von PA-Infektionen könnte die Impfung sein. Die bisherigen Impfstudien waren jedoch nicht überzeugend. In einer Cochrane-Analyse von 2015 [129] kommen die Autoren zu dem Schluss, die PA-Impfung derzeit nicht zu empfehlen.

6. Zusammenfassung

Der bei Mukoviszidose zugrundeliegende Gendefekt im CFTR-Gen führt in der Lunge zur Einschränkung der mukoziliären Clearance und dadurch zur Kolonisation mit pathogenen und fakultativ pathogenen Bakterien sowie zu einer Infektion und Inflammation mit zunehmender Dysfunktion des Lungenparenchyms. Der für die Prognose wichtigste Erreger ist *P. aeruginosa* (PA).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob unter der langjährigen Inhalationstherapie mit Tobramycin und/oder Colistin eine Resistenzentwicklung zu beobachten ist und ob sich die beiden Substanzen in ihrer Resistenzentwicklung unterscheiden.

Dazu wurden im Christiane Herzog - Zentrum für Mukoviszidose der Universität Würzburg 22 chronisch mit PA besiedelte Patienten, die im Studienzeitraum von 1989 bis 2009 eine langdauernde Suppressionstherapie erhalten hatten, nachverfolgt, um die Resistenzentwicklung seit dem Erstnachweis von PA zu klären.

Insgesamt wurden 1.844 PA-Stämme isoliert, davon waren 1.331 (72,2%) nicht-mukoid und 513 mukoid (27,8%).

Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten mit individuellen Genotypen besiedelt sind und dass jeder Patient über den gesamten Beobachtungszeitraum mit einem Genotyp kolonisiert ist, auch wenn sich die Stämme phänotypisch und im Verlauf in der Sensitivität gegen Antibiotika unterscheiden.

Unter der Inhalationstherapie mit Colistin wurden trotz hohen Einsatzes (4.404 Patienten-Wochen) keine Resistenzen nachgewiesen, bei wenigen Patienten trat lediglich eine geringe Erhöhung der MHK-Werte auf. Dagegen wurden bei der Inhalation mit Tobramycin trotz geringeren Einsatzes (1.736 Patienten-Wochen) Resistenzen bei 30,4% der Isolate und bei 16 (72,7%) Patienten nachgewiesen. Die parenterale Anwendung von Tobramycin scheint dagegen keinen Einfluss auf die Tobramycin-Resistenzentwicklung zu haben.

Soweit bei den kleinen Fallzahlen beurteilbar, scheint das Auftreten Tobramycin-resistenter Stämme mit den folgenden drei Risikofaktoren assoziiert zu sein: erstens frühzeitige Besiedlung mit PA, zweitens eine langfristige Suppressionstherapie; drittens vorwiegend mit Tobramycin durchgeführte Inhalationstherapie über einen langen Zeitraum. Ein Beweis dafür konnte nicht erbracht werden, da die statistische Signifikanz nach Korrektur der mit dem Permutationstest signifikanten p-Werte nach Bonferroni nicht gegeben war. Da aber diese Tests aufgrund der kleinen Stichproben wenig Aussagekraft haben und die im Permutationstest festgestellten signifikanten p-Werte deutlich geringer waren, können diese Signifikanzen explorativ bewertet werden. Zur endgültigen Klärung dieser Frage könnten Folgestudien mit größeren Fallzahlen beitragen.

Die Ergebnisse der Studie unterstreichen die Bedeutung des frühzeitigen Screenings auf PA sowie die Bedeutung der frühzeitigen Eradikationstherapie und die damit verbundene zeitliche Verzögerung der chronischen PA-Besiedlung. Darüber hinaus zeigen sie, dass unter der Inhalation mit Tobramycin das Risiko der Resistenzentwicklung größer ist als bei der Inhalation mit Colistin.

Die Ergebnisse unterstreichen ferner die Bedeutung molekulargenetischer Methoden in der CF-Diagnostik, insbesondere zur Detektion resistenter Genotypen (Klone).

7. Literaturverzeichnis

1. Köhnlein T, Welte T. Mukoviszidose (Zystische Fibrose). *Der Pneumologe* 2014; 11: 65-76.
2. Sens B, Stern M. Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011. Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen, Mukoviszidose e.V. und Mukoviszidose Institut GmbH, Bad Honnef. Hippocampus Verlag 2012.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plasvic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1072.
4. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *New Engl J Med* 2005; 352: 1992-2001.
5. Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1359-1371.
6. Boucher RC. Relationship of airway epithelial ion transport to chronic bronchitis. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 66-70.
7. Oakland M, Sinn PL, McCray PB. Advances in cell and gene-based therapies for cystic fibrosis lung disease. *Mol Ther* 2012; 20: 1108-1115.
8. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681-689.
9. Williams HD, Behrends V, Bundy JG, Ryall B, Zlosnik JEA. Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: do population shifts caused by the osmotic sensitivity of infecting bacteria explain the effectiveness of this treatment? *Front Microbiol* 2010; 1: 120.
10. Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 179-196.
11. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary Infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918-951.
12. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 486-491.

13. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 194-222.
14. Etherington C, Naseer R, Conway SP, Whitaker P, Denton M, Peckham DG. The role of respiratory viruses in adult patients with cystic fibrosis receiving intravenous antibiotics for a pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros* 2014; 13: 49-55.
15. Olesen HV, Nielsen LP, Schiøtz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatient pediatric cystic fibrosis clinic. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 1197-1204.
16. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, Saiman L. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis. *Chest* 2016; 149: 390-400.
17. Raidt L, Idelevich EA, Dübbers A, Küster P, Drevinek P, Peters G, Kahl BC. Increased prevalence and resistance of important pathogens recovered from respiratory specimens of cystic fibrosis patients during a decade. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34: 700-706.
18. AWMF. S2k-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“. AWMF-Register-Nummer 026/023, 2013.
19. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) 24; Urban und Fischer Verlag 2006.
20. Schwarz C, Staab D. Zystische Fibrose und ihre Komplikationen. *Internist* 2015; 3: 1-12.
21. Schwarz C. Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). *Arzneimitteltherapie* 2013; 31: 80-88.
22. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PO, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 55-65.
23. Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, Issue 4. Art. No.: CD004197.
24. Döring G, Høiby N, for the Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 67-91.
25. AWMF. S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“, Modul 1: Diagnostik und Therapie nach dem ersten Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. AWMF-Register-Nr. 026/022, 2014.

26. Döring G, Conway SP, Heijerman GM, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000; 16: 749-767.
27. AWMF. S3-Leitlinie "Lungenerkrankung bei Mukoviszidose", Modul 2: Diagnostik und Therapie bei der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. AWMF-Register-Nr. 020/018, 2017.
28. Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, Høiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF center. *APMIS* 1994; 102: 674-680.
29. Koch C, Hjelt K, Pedersen SS, Jensen ET, Jensen T, Lang S, Valerius NH, Pedersen M, Høiby N. Retrospective clinical study of hypersensitivity reactions to aztreonam and six other beta-lactam antibiotics in cystic fibrosis patients receiving multiple treatment courses. *Rev Infect Dis* 1991; 13: S608-S611.
30. Magalhaes ML, Blanchard JS. Aminoglycosides: mechanisms of action and resistance. Mayers DL (ed.). *Antimicrobial Drug Resistance*. Humana Press 2009: 171-181.
31. Möllering RC. In vitro antibacterial activity of the aminoglycoside antibiotics. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (Suppl 2): S212-S232.
32. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 423-435.
33. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 535-543.
34. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* 2013; 8: 1-20.
35. Littlewood JM, Koch C, Lambert PA, Høiby N, Elborn JS, Conway SP, Dinwiddie R, Duncan-Skingle F. A ten year review of colomycin. *Respir Med* 2000; 94: 632-640.
36. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *BioMed Res Int* 2015; Article ID 679109: 1-11.
37. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 17: 1209-1223.

38. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 644-648.
39. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 444-452.
40. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 2009; 89: 93-110.
41. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; 288: 1251-1254.
42. Oliver A, Mena A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin Microbiol Inf Dis* 2010; 16: 798-808.
43. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Enghusen Poulsen H, Høiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2276-2282.
44. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S. Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 841-851.
45. Helmann JD. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microbiol Physiol* 2002; 46: 47-110.
46. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.
47. Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis infection. *Clin Rev Allerg Immunol* 2008; 35: 124-134.
48. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat Rev* 2013; 12: 791-808.
49. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.
50. Davies JC, Bilton D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care* 2009; 54: 628-640.

51. Spoering AI, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183: 6746-6751.
52. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001; 183: 5395-5401.
53. Whiteley M, Banger MG, Bumgamer RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413: 860-864.
54. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell to cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 319-346.
55. Schuster M, Lostroh P, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 2003; 185: 2066-2079.
56. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-640.
57. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 88-94.
58. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362: 1888-1893.
59. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirks JE, Miller GH, Burns JL, Garber RL. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis* 2000; 181: 1180-1184.
60. Shawar RM, MacLeod DL, Garber RL, Burns JL, Stapp JR, Clausen CR, Tanaka SK. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2877-2880.
61. Elliot D, Burns JL, Hofman LR. Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3024-3026.
62. Römling U. C-di-GMP - ein neuer sekundärer Botenstoff in Bakterien. *BIOspektrum* 2007; 13: 134-136.

63. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; 436: 1171-1175.
64. Koerner-Rettberg C, Ballmann M. Colistimethate sodium for the treatment of chronic pulmonary infection in cystic fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence* 2014; 9: 99-112.
65. Olaiten AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014; 5: 1-18.
66. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 48: 583-591.
67. Edrington TTC, Kintz E, Goldberg JB, Tamm LK. Structural basis for the interaction of lipopolysaccharide with outer membrane protein H (OprH) from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2011; 286: 39211-39223.
68. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M8-A6. Villanova, PA 2005.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S20, Vol. 30. Wayne, PA 2010.
70. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest[®], broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3726-3730.
71. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, Farooque K, Sharma V, Misra MC. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e596-e601.
72. Mahenthiralingam E, Campbell M, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1129-1135.
73. LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 299-323.

74. Smyth AR, Bell SC, Snezana B, Bryon M, Duff A, Flume P, Kashirskaya N, Munck A, Ratjen F, Schwarzenberg SJ, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Taccetti C, Ullrich G, Wolfe S. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best practice guidelines. *J Cyst Fibros* 2014; 13: S23-S42.
75. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS, for the Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies *J Cyst Fibros* 2012; 11: 461-479.
76. Ballmann M, Rabsch R, von der Hardt H. Long term follow up of changes in FEV₁ and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 732-737.
77. Schuster A, Haliburn C, Döring G, Goldman MH, for the Freedom Study Group. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. *Thorax* 2013; 68: 344-350.
78. Uttly L, Harnan S, Cantrell A, Taylor C, Walshaw M, Brownlee K, Tappenden P. Systematic review of the dry powder inhalers colistimethate sodium and tobramycin in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 2013; 22: 476-486.
79. Hodson ME, Gallagher CG, Govan JRW. A randomised clinical trial of nebulised tobramycin or colistin in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2002; 20: 658-664.
80. Nährlich L, Zimmer KP. Neugeborenen-Screening auf Mukoviszidose: Lasst uns beginnen! *Dtsch Arztebl* 2013; 110: 354-355.
81. Hansen CR, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 523-530.
82. Ratjen F, Munck A, Kho P, Angyalosi G, for the ELITE Study Group. Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. *Thorax* 2010; 65: 286-291.
83. Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Costantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S, on behalf of the Italian Group for *P. aeruginosa* Eradication in Cystic Fibrosis. Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. *Thorax* 2012; 67: 853-859.
84. Treggiari MM, Retsch-Bogart G, Mayer-Hamblett N, Khan U, Kulich M, Kronmal M, Williams J, Hiatt P, Gibson RL, Spencer T, Orenstein D,

- Chatfield BA, Froh DK, Burns JL, Rosenfeld M, Ramsey BW, and for the EPIC Investigators. Comparative efficacy and safety of four randomized regimens to treat early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2011; 165: 847-856.
85. Geller DE, Pitlick WH, Nardella PA, Tracewell WG, Ramsey BW. Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. *Chest* 2002; 122: 219-226.
86. Geller DE. Aerosol antibiotics in cystic fibrosis. *Respir Care* 2009; 54: 658-670.
87. Konstan MW, Flume PA, Kappler M, Chirond R, Higginse M, Brockhaus F, Zhangg J, Angyalosi G, Heg E, Gelle DE on behalf of the EAGER Study Investigators. Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. *J Cyst Fibros* 2011; 10: 54-61.
88. Lenoir G, Antypkin YG, Miano A, Moretti P, Zanda M, Varoli G, Monici Preti PA, Aryayev NL. Efficacy, safety, and local pharmacokinetics of highly concentrated nebulized tobramycin in patients with cystic fibrosis colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Paediatr Drugs* 2007; 9 (Suppl 1):11-20.
89. Mombelli G, Coppens L, Thys JP, Klastersky J. Anti-*Pseudomonas* activity in bronchial secretions of patients receiving amikacin or tobramycin as a continuous infusion. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 72-75.
90. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev MK, Borowitz D, Bowman MC, Marshall BC, Marshall S, Smith AL, for the Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. *New Engl J Med* 1999; 340: 23-30.
91. Ratjen F, Rietschel E, Kasel D, Schwiertz R, Starke K, Beier H, van Koningsbruggen S, Grasemann H. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 306-311.
92. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PO, Wang H, Høiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 85: 7-23.
93. Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 557-562.
94. Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 363-370.

95. Burns JL, Burns JM, Dalfsen V, Shawar RM, Otto KL, Garber RL, Quan JM, Montgomery AB, Albers GM, Ramsey BW, Smith AL. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1999; 179: 1190-1196.
96. Clark ST, Caballero JD, Cheang M, Coburn B, Wang PW, Donaldson SL, Zhang Y, Liu M, Keshavjee S, Yau YCW, Waters VJ, Tullis DE, Guttman DS, Hwang DM. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Nature Scientific Reports* 2015; 5: 1-10.
97. Mayer-Hamblett N, Ramsey BW, Kulasekara HD, Wolter DJ, Houston LS, Pope CE, Kulasekara BRT, Armbruster CR, Burns JL, Retsch-Bogart G, Rosenfeld M, Gibson RL, Miller SI, Khan U, Hoffman LR. *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes associated with eradication failure in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 624-631.
98. Manos J, Rose BR, Wainwright CE, Zablotska IB, Cheney J, Turnbull L, Witchchurch CB, Grimwood K, Harmer C, Anuj SN, Harbour C: ACFBAL study group. Virulence factor expression patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains from infants with cystic fibrosis. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 1583-1592.
99. Sousa AM, Perei MO. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during Infection development in cystic fibrosis lungs - a review. *Pathogens* 2014; 3: 680-703.
100. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SEH, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 2005; 293: 581-588.
101. Schüle T. *In vitro* activity of aerosolized agents colistin and tobramycin and five intravenous agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in southwestern Germany. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 403-406.
102. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horn M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 123-127.
103. Wolz C, Kiosz G, Ogle JW, Vasil ML, Schaad U, Botzenhart K, Döring G. *Pseudomonas aeruginosa* cross-colonization and persistence in patients with cystic fibrosis. Use of a DNA probe. *Epidem Inf* 1989; 102: 205-214.

104. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 444-452.
105. Jansen G, Mahrt N, Tueffers L, Barbosa B, Harjes M, Adolph G, Friedrichs A, Krenz-Weinreich A, Rosenstiel R, Schulenburg H. Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2016: 182-194.
106. Cramer N, Wiehlmann L, Ciofu O, Tamm S, Høiby N, Tümmler B. Molecular epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in cystic fibrosis. *PlosOne* 2012; 7: e50731.
107. Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha T, Gravelle A, Davidson AGF, Wong LTK, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 988-993.
108. Landman D, Georgescu C, Martin DO, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 449-465.
109. Tan TY, NG SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 541-544.
110. Moskowski SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, Doctor M, Saiman L. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1416-1423.
111. van der Heijden IM, Levin AS, De Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, Barone AA, Costa SF. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007, 6: 1-7.
112. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017.
113. Moss RB. Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis. *Chest* 2002; 121: 55-63.
114. Burns JL, Emerson J, Stapp JR, from the Division of Infectious Disease and the Cystic Fibrosis Center, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Department of Pediatrics and Department of Laboratory Medicine,

- Ramsey BW, Clausen CR. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 158-163.
115. Jensen T, Pedersen SS, Game S, Heilmann C, Hefty N, Koch C. Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19: 831-838.
116. Hogardt M, Schmoldt S, Götzfried M, Adler A, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1057-1061.
117. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Grimwood K. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr* 2001;138: 699-704.
118. Johannsen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler Ta, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 391-397.
119. Ojieniyi B, Frederiksen B, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 177-181.
120. Zimakoff J, Høiby N, Rosendal K, Guilbert JP. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection and the role of contamination of the environment in a cystic fibrosis clinic. *J Hosp Infect* 1983; 4: 31-40.
121. Zuckerman JB, Zuaro DE, Prato BS, Ruoff KL, Sawicki RW, Quinton HB, Saiman L, the Infection Control Study Group. Bacterial contamination of cystic fibrosis clinics. *J Cyst Fibros* 2009; 8: 186-192.
122. Jain M, Saiman LM, Sabadosa K. Point: Does the risk of cross infection warrant exclusion of adults with cystic fibrosis from cystic fibrosis foundation events? Yes. *Chest* 2014; 145: 678-680.
123. Ashish A, Shaw M, Winstanley C, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increasing resistance of the Liverpool Epidemic Strain (LES) of *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) to antibiotics in cystic fibrosis (CF) - a cause for concern? *J Cyst Fibros* 2012; 11: 173-179.
124. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang H, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 161-168.

125. Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, Roesler U, Käsbohrer A. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. *PlosOne* 2016; 11: 1-10.
126. Assael BM, Pressler T, Bilton D, Fayon M, Fischer R, Chiron R, LaRosa M, Knoop C, McElvaney N, Lewis SA, Bresnik M, Montgomery AB, Oermann CM for the AZLI Active Comparator Study Group. Inhaled aztreonam lysine vs. inhaled tobramycin in cystic fibrosis: A comparative efficacy trial. *J Cyst Fibros* 2013; 12: 130-140.
127. Wainwright CE, Quittner AL, Geller DE, Nakamura C, Wooldridge JL, Gibson RL, Lewis S, Montgomery AB. Aztreonam for inhalation solution (AZLI) in patients with cystic fibrosis, mild lung impairment, and *P. aeruginosa*. *J Cyst Fibros* 2011; 10: 234-242.
128. Elborn JS, Vataire AL, Fukushima A, Aballea S, Khemiri A, Moore C, Medic G, Hemels MIEH. Comparison of inhaled antibiotics for the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in patients with cystic fibrosis: systematic literature review and network meta-analysis. *Clin Ther* 2016; 1: 1-23.
129. Johansen HK, Gøtzsche PC. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 8. Art. No.: CD001399.

Anhang

Publikation der Arbeit

Valenza G, Radike K, Schoen C, Horn S, Oesterlein A, Frosch M, Abele-Horn M, Hebestreit H. Resistance to tobramycin and colistin in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronically colonized patients with cystic fibrosis under antimicrobial treatment. Scand J Infect Dis 2010; 42 (11-12): 885-889.

Abkürzungen

AG	Aminoglykosid
AlgU	Sigmafaktor von <i>P. aeruginosa</i> (AlgT)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumion
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<i>Cftr</i> -Gen	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Gen
Cl ⁻	Chloridion
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMS-Na	Colistimethat-Natrium
CO ₂	Kohlendioxid
d	Durchschnitt (= arithmetischer Mittelwert)
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Etest®	Epsilontest, Gradientendiffusionstest
Fe ³⁺	Eisenion
FSM	French Society of Microbiology
g	Gramm
h	Stunde
HSL	N-Acetyl-Homoserin-Lacton
HLR	High level resistance (Tobramycin-MHK-Wert ≥ 256 µg/mL)
IHM	Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
i.v.	intravenös
KBE	koloniebildende Einheit
LLR	Low level resistance (Tobramycin-MHK-Wert ≤128 µg/mL)
LPS	Lipopolysaccharide
Mg ²⁺	Magnesiumion
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration in µg/mL
µL	Mikroliter
Mio IE	Million Internationale Einheiten
MiQ	Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTLA	Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin
MucA,B,C	Anti-Sigmafaktoren
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NH ₂ -Gr.	Aminogruppe
Nr.	Nummer
O ²⁻	Sauerstoffion
OH-Gr.	Hydroxylgruppe
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

p. i.	per inhalationem
p. o.	peroral, per os
QS	Quorum Sensing
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNI	reactive nitrogen intermediates
ROS	reactive oxygen species
SCV	Small Colony Variants
spp.	Spezies; Bakterien einer Gattung
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
WHO	World Health Organization

Formblatt zur Erfassung der Patientendaten (Beispiel)

Patient Nr. X (Name, Vorname, Geburtsdatum)							
Jahr	Monat	Regime der i.v.-Therapie	Inhalation	Nachweis von <i>P. aeruginosa</i>		Sensitivität von <i>P. aeruginosa</i>	
				mukoid	Menge	Tobra	Colistin
2000	Februar			nein	+++	r	s
	Juni			nein	++	s	s
	Juli			nein	+++	s / r	s / s
2001	Januar	Ceftazidim + Tobramycin		nein	++	s / r	s / s
	Februar		Colistin				
	März		Colistin				
	April		Colistin	nein	++	s / r	s / s
	Mai		Colistin				
	Juni		Colistin				
	Juli		Colistin	nein	+++	s	s
	August	Ceftazidim + Tobramycin		nein	+++	s / s	s / s
	Oktober		Colistin	nein	+++	s	s
	November	Ceftazidim + Tobramycin		nein	+	s	s
	Dezember		Colistin				
2002	Januar	Ceftazidim + Tobramycin					
	Februar		Colistin	nein	+++	s	s
	März		Colistin	nein	+++	s	s
	April	Ceftazidim + Tobramycin					
	Mai		Colistin	ja / nein	+++	s / r	s / s
	Juni	Meropenem + Tobramycin					
	Juli		Colistin	nein	++	s	s
	August		Colistin				
	September		Colistin				
	Oktober		Colistin	nein	++	s	s
	November	Ceftazidim + Tobramycin		nein	+++	s	s
	Dezember		Colistin				

2003	Januar							
	Februar		Colistin					
	März		Colistin	nein	+++	s / s	s / s	
	April	Ceftazidim + Tobramycin						
	Mai		Colistin	nein	++	s	s	
	Juni		Tobramycin	nein	+++	s	s	
	Juli	Meropenem + Tobramycin						
	August		Tobramycin	nein	++	s	s	
	September	Ceftazidim + Tobramycin		nein	+++	s / s	s / s	
	Oktober		Tobramycin					
	November		Colistin					
	Dezember		Tobramycin					
2004	Januar		Colistin	nein	+++	s / s	s / s	
	Februar		Tobramycin					
	März	Ceftazidim + Tobramycin		ja / nein	+++	s / s	s / s	
	April		Tobramycin	ja / nein	+++	s / r	s / s	
	Mai		Colistin					
	Juni		Tobramycin	ja	+++	s	s	
	Juli	Meropenem + Tobramycin						
	August		Tobramycin					
	September		Colistin	ja	+++	s	s	
	November		Colistin	ja / nein	+++	s / s	s / s	
	usw.	Dezember		Tobramycin	ja / nein	+++	s / s	s / s

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Helge Hebestreit, dem stellvertretenden Direktor der Kinder- und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Betreuung der Dissertation. Durch seine intensive Förderung und Anteilnahme sowie durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen hat er wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Guiseppe Valenza, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen, für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen, die Hilfe bei mikrobiologischen Fragen, das Überlassen von Bildmaterial sowie die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Matthias Frosch, dem Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie an der Universität Würzburg, danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Dissertation und für die Überlassung der Daten aus dem Archiv.

Frau Dr. med. Kerstin Radike, Kinderärztin im Christiane Herzog - Zentrum, für Mukoviszidose gebührt mein Dank für die Unterstützung bei Fragen zu der Praxis in der Behandlung von Patienten mit Mukoviszidose.

Ebenso danke ich Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Dr. med. Christoph Schoen und Frau Anett Oesterlein für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Niklas Willrich und Herrn Dr. med. Tim Eckmanns vom Robert Koch-Institut, Berlin, Fachgruppe 37: Nosokomiale Infektionen, Surveillance von Antibiotikaresistenz und -verbrauch, für die Beratung bei der Statistik.

Dem Team des Christiane Herzog - Zentrums für Mukoviszidose in der Kinder- und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg gilt mein besonderer Dank für die engagierte Hilfe bei der Aufarbeitung der Patientenakten.