

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des  
Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, Lehrkrankenhaus der Charité Berlin

## **DISSERTATION**

### **„Untersuchungen zum Postantibiotischen Effekt bei Pseudomonas aeruginosa- Isolaten einer Intensivstation“**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Frau Heike Hummel

aus: Crimmitschau

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Link

2. Prof. Dr. med. Steinhauer

3. PD Dr. med. Bär

Datum der Promotion: 19.07.1999

## Inhaltsverzeichnis

---

Seite

### 1 Einleitung

---

1.1	Die Bakterienspezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.2	Therapie und Resistenzlage von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.3	Wirkmechanismus der Antibiotika	6
1.4	Der Postantibiotische Effekt (PAE)	7
1.5	Aufgabenstellung	9

### 2 Material und Methoden

---

2.1	Bakterienstämme	9
2.2	Nährmedien	9
2.3	Antibiotika	10
2.4	Minimale Hemmkonzentrations-Bestimmung (MHK)	10
2.5	Minimale Bakterizide Konzentrations-Bestimmung (MBK) von Amikacin	11
2.6	Bakterizidiekurven	11
2.7	Fotographische Darstellung der Bakterienzellen	12
2.8	Bestimmung des Postantibiotischen Effektes	12
2.8.1	Statistische Berechnung	14
2.8.2	Quantifizierung des Postantibiotischen Effektes	14

### 3 Ergebnisse

---

3.1	MHK der Teststämme	15
3.2	MBK gegen Amikacin	16
3.3	Bakterizidiekurven	17

<b>3.4</b>	<b>Postantibiotischer Effekt mit einmaliger Exposition von Amikacin, Ceftazidim und die Kombination beider Antibiotika</b>	<b>30</b>
3.4.1	PAE bei Amikacin	30
3.4.2	PAE bei Ceftazidim	32
3.4.3	PAE bei Ceftazidim plus Amikacin	34
<b>3.5</b>	<b>Postantibiotischer Effekt mit dreimaliger Exposition von Amikacin, Ceftazidim und der Kombination beider Antibiotika</b>	<b>36</b>
3.5.1	PAE bei Amikacin	36
3.5.2	PAE bei Ceftazidim	38
3.5.3	PAE bei Ceftazidim plus Amikacin	40
3.5.4	Fotographische Darstellung der Bakterienzellen	42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
<hr/>		
4.1	Methoden der PAE-Bestimmung	51
4.2	Inokulum-Effekt, Wirkung auf die Bakterizidie	51
4.3	Aminoglykoside und der PAE	53
4.4	Beta-Lactamantibiotika und der PAE	53
4.5	Kombination der getesteten Antibiotika	54
4.6	PAE und mehrfache Antibiotikaexposition	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<hr/>		
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<hr/>		
	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>64</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>65</b>

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Die Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa*

Der Ablauf einer Infektion unterliegt multifaktoriellen Interaktionen zwischen chemischen Strukturelementen von Krankheitserregern bzw. deren Stoffwechselprodukten und den verschiedenen Parametern der Immunantwort. Bei einer antimikrobiellen Chemotherapie können Antibiotika nicht nur mit dem Keim, sondern auch unmittelbar mit der Expression einer humoralen und/oder zellulären Abwehr interagieren (Gillissen 1992).

Die Auswahl der antimikrobiellen Substanzen für die empirische Initialtherapie einer Infektion hat sowohl das vorherrschende Keimspektrum als auch die Virulenz der verschiedenen relevanten Erreger zu berücksichtigen. Besonders gefährlich, weil rasch letal verlaufend, sind inadäquat behandelte Infektionen durch nosokomiale gramnegative Erreger, besonders durch Pseudomonaden. Nosokomiale *Pseudomonas*-Infektionen sind mit einer erhöhten Letalitätsrate in Vergleich zu anderen gramnegativen Infektionen verbunden, vor allem Sepsis, Pneumonien und Meningitis (Baltch et al. 1996).

*Pseudomonas aeruginosa* ist die am längsten bekannte und humanmedizinisch wichtigste *Pseudomonas*art. Gessard züchtete sie 1882 erstmals in Reinkultur und nannte sie *Bacterium pyocyaneum*.

Der Begriff *Pseudomonas* wurde 1894 von Migula eingeführt und sollte ursprünglich alle geraden, stäbchenförmigen Bakterien mit polaren Bewegungsorganellen zu einer einzigen Gattung zusammenfassen. Erst die wachsende Einsicht in die taxonomische Bedeutung bestimmter physiologischer Merkmale, verbesserte Technik der Geißeldarstellung sowie molekularbiologische Untersuchungsverfahren brachten in den vergangenen zwanzig Jahren eine Vereinheitlichung und Präzisierung der Gattungsbeschreibung. Das Genus *Pseudomonas* bleibt heterogen und zerfällt in vier rRNA-Ähnlichkeitsgruppen. Unter diesen ist die rRNA-Homologiegruppe I die größte und umfaßt so typische Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Pseudomonas putida* (Zielmann 1995).

Im Vergleich zu anderen Erregern ist *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage, viele verschiedene schädigende Substanzen zu bilden. Zu den zellgebundenen Substanzen gehören die Lipopolysaccharide mit endotoxischer Wirkung und die Fähigkeit zur Bildung einer Schleimkapsel. Extrazellulär abgesonderte Substanzen umfassen Exotoxin A, Exoproteasen und Hämolyse.

## 1.2 Therapie und Resistenzlage von *Pseudomonas aeruginosa*

Bei der Therapie von *Pseudomonas*-Infektionen sollten folgende Probleme beachtet werden:

1. relativ hohe MHK-Werte bei *Pseudomonaden* wirksamen Antibiotika
2. die Fülle verschiedener Resistenzmechanismen

Unter Resistenzmechanismen versteht man z.B. die Veränderung der Zellpermeabilität, die Produktion von Beta-Laktamasen und die Veränderung des Antibiotika-Angriffsortes in der Bakterienzelle

(Wallrauch-Schwarz et al. 1993).

Hier wird durch Mutation die Struktur des jeweiligen Angriffsortes (Penicillinbindende Proteine) so verändert, daß entsprechende Antibiotika nicht binden bzw. angreifen können.

Um diesen Resistenzproblemen zu begegnen, wird bei nachgewiesenen oder vermutete Pseudomonas-Infektionen eine Kombinationstherapie zweier Pseudomonas-wirksamer Substanzen empfohlen (Grassias-Berardi et al. 1986). Hilf et al. (1989) bestätigten die Anwendung einer Kombinationstherapie bei Pseudomonas-Bakteriämie in einer klinischen Studie. Hierbei lag die Mortalitätsrate bei Monotherapie signifikant höher wie bei einer Kombinationstherapie.

Die Kenntnis der relevanten Parameter für die Beschreibung der antimikrobiellen Wirkung von Chemotherapeutika ist die Grundlage für die Auswahl und individuelle Dosierung der antimikrobiellen Therapie. Zudem ist die detaillierte Kenntnis der Abtötungskinetik von antimikrobiellen Medikamenten wesentlich für die Evaluation des optimalen Dosierungsregimes. Zahlreiche Parameter existieren zur Beschreibung der Wirkung von antimikrobiellen Chemotherapeutika (Blaser 1990):

- MHK oder MBK
- Abtötungsgeschwindigkeit
- Konzentrationsabhängigkeit der Bakterizidie
- freie, nicht proteingebundene Konzentration des Antibiotikums
- Fläche unter der Serumkonzentration-Zeit-Kurve (AUC)
- Postantibiotischer Effekt
- Metabolisierung von Antibiotika
- Ausscheidungsart
- Konzentration im Serum oder am Angriffsort
- Proteinbindung des Antibiotikums.

### 1.3 Wirkmechanismus der Antibiotika

Antimikrobielle Substanzen schädigen die Erreger durch Einwirkung auf die Synthese von Peptidoglykan, Proteinen, Nucleinsäuren, Folsäuren bzw. durch Einwirken auf die Struktur und Funktion der Zellmembran. Der Vorteil, Antibiotika mit unterschiedlichen Angriffspunkten beim Erreger zu haben liegt darin, bei Auftreten einer Resistenz ausweichen zu können auf eine Substanz mit einem alternativen Wirkmechanismus.

Antibiotika welche in die Peptidoglykansynthese eingreifen wirken bakterizid.

Beta-Laktamantibiotika, zu denen die Cephalosporine gehören, interferieren mit der letzten Phase der Peptidoglykansynthese. Sie hemmen die Transpeptidase und verhindern so die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des Murein (Peptidoglykan); Folge ist die Lyse der Zelle (Gerber 1993).

Aminoglykosidantibiotika hemmen die Proteinsynthese durch Bindung an die 30S-Untereinheit des Ribosoms. Sie verhindern die Vervollständigung des Startkomplexes. Folge ist, daß die in der messenger-RNA kodierten Informationen nicht auf das zu bildende Protein übertragen werden können. Dieser Lesefehler bewirkt einen fehlerhaften Aufbau von Zytoplasma-Proteinen. Hieraus resultieren Defekte beim Aufbau funktionsfähiger Enzyme und eine Schädigung der Membranfunktion. Ausfließen von Zytoplasma führt schließlich zur Lyse der Bakterienzelle = bakterizide Wirkung (Piepersberg 1985).

## 1.4 Der Postantibiotische Effekt

Zum Studium der optimalen Wahl von Dosis und Dosierungsintervall bei antimikrobiellen Substanzen stellen pharmakodynamische in vitro-Modelle eine gute Alternative zu Tierversuchen dar. Die Zeit bis die Minimale Hemmkonzentration eines Antibiotikums erreicht ist, kennzeichnet eines der wichtigsten pharmakodynamischen Parameter für die Effektivität (Craig 1995).

Der Postantibiotische Effekt wurde erstmals 1944 von Bigger beschrieben, sowie 1948 von Parker und Luse als Wachstumshemmung der Keime nach Antibiotikaentfernung als ein Phänomen, das bei vielen antibakteriellen Substanzen vorkommt.

Insbesondere die Arbeitsgruppe von Craig hat sich um die Klärung und Definition des Postantibiotischen Effekts sehr bemüht. Dieser wurde von ihnen als die persistierende Suppression des bakteriellen Wachstums nach einer vorangehenden, zeitlich exakt definierten, antibiotischen Exposition oberhalb der minimalen Hemmwerte des jeweiligen Keimes definiert.

Eine größere Zahl von unterschiedlichen in vitro-Methoden sind zur Erfassung des Postantibiotischen Effektes eingesetzt worden, unter anderem die Zell-Zähl-Methode und der Bioluminescence assay des bakteriellen ATP.

Bei der Zell-Zähl-Methode erfolgt die direkte Messung der Zahl der überlebenden und erneut wachsenden Bakterien in der Kultur nach Antibiotika-Entfernung.

Die Messung des bakteriellen ATP beinhaltet der Bioluminescence assay. Hier ist eine Trennung von lebenden und toten Zellen nicht möglich (Gerber 1993), folglich ist mit dieser Methode auch die Bakterizidie nicht bestimmbar.

Aus den Ergebnissen zahlreicher Untersuchungen bei unterschiedlichen Bakterien und Antibiotika ist ersichtlich, daß zahlreiche grampositive und gramnegative Erreger, aber auch Mykobakterien und Pilze prinzipiell einen postantibiotischen Effekt aufweisen können. Gegenüber den grampositiven Keimen zeigen Beta-Laktamantibiotika kurze, maximal zwei Stunden reichende, postantibiotische Effekte, während andere Substanzen wie Erythromycin, Clindamycin und Rifampicin in der Regel längere Effekte aufweisen. Während bei gramnegativen Erregern wie z.B. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber den Beta-Laktamantibiotika in niedriger Konzentration (MHK-Werte) mit Ausnahme von Imipenem keine postantibiotischen Wirkungen zu registrieren sind; weisen Aminoglykoside, Tetracykline und Chinolone zum Teil beträchtliche postantibiotische Effekte auf. Auch gegenüber *Candida* Spezies werden mit Amphotericin B wie auch mit 5-Flucytosin postantibiotische Effekte gesehen; während mit Imidazol-Derivaten gegenüber diesen Erregern das Phänomen nicht auftritt (Gerber et al. 1982).

Auf der Basis von exakten pharmakodynamischen Berechnungen hat man seit Jahren versucht, vor allem bei Patienten mit Niereninsuffizienz eine Verlängerung des Dosierungsintervalls zu begründen. Mittlerweile gibt es eine Reihe von klinischen Studien mit verschiedenen Aminoglykosiden, die das Konzept einer Einmalgabe gut dokumentieren (Knothe 1996, Raz et al. 1995).

Die Dauer des Postantibiotischen Effektes nimmt mit zunehmender Expositionszeit und Konzentration des Antibiotikums zu, ist aber abhängig von der Keimspezies und der Art des Antibiotikums (Gerber 1993).

*Pseudomonas aeruginosa* ist in der in vitro-Testung gegenüber Ceftazidim hoch sensibel. In der

kalkulierten Initial-Therapie bei Infektionen in der Intensivmedizin findet es deshalb seine Anwendung, vor allem als Kombinationspartner von Aminoglykosiden.

Die Resistenzlage wird durch die Produktion von chromosomalen Beta-Laktamasen bestimmt. Bei Langzeitverabreichung von antipseudomonalen Wirkstoffen bei Patienten mit chronischer Kolonisation ist die Resistenzentwicklung vorabzusehen (Baltch et al. 1996). Die Therapie von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen stellt somit oft ein Problem dar.

Gerber und Craig (1982) untersuchten den Postantibiotischen Effekt von bakteriostatisch wirkenden Antibiotika. Rifampicin, Tetracyclin und Erythromycin weisen in relativ niedriger Konzentration einen PAE auf, und zwar sowohl gegenüber grampositiven wie auch gramnegativen Krankheitserregern. Um in vitro einen Postantibiotischen Effekt von Beta-Laktamantibiotika auf gramnegative Bakterien zu demonstrieren, werden hohe, unter oraler Therapie im Serum nicht erreichbare Medikamentenkonzentrationen benötigt.

Die Dauer des PAE ist abhängig von der Art des Antibiotikums, dessen Konzentration sowie auch von der Dauer der vorangegangenen Exposition bei mehrmaliger Exposition (Mackenzie et al. 1993, Gerber 1993, Armstrong et al. 1981).

Hinsichtlich des Mechanismus des postantibiotischen Effektes bestehen noch keine präzisen Vorstellungen. Es wird davon ausgegangen, daß durch die Antibiotika-Persistenz an bakteriellen Bindungsstellen eine letale Schädigung verursacht wird. Suller et al. 1998 sehen im PAE ein komplexes Geschehen, welches sich für jeden Organismus individuell gestaltet. Es ist bekannt, daß Erythromycin, Tetracycline und Chloramphenicol an spezifischen Untereinheiten von Ribosomen empfindlicher Bakterien gebunden werden. In ähnlicher Weise unterliegen auch die Aminoglykosidantibiotika einer letalen und irreversiblen Bindung an ribosomale Bestandteile. Es wird daher angenommen, daß während der Exposition gegenüber den wirksamen Antibiotika die Protein- oder RNA-Synthese so vermindert wird, daß ein Verlust an funktionellen Proteinen mit großer Bedeutung für den Intermediärstoffwechsel und für das Wachstum eintritt. Die Zeitdauer des PAE könnte daher die Periode der Protein-Resynthese (Synthese neuer Enzyme) repräsentieren (Mackenzie et al. 1993).

Spivey (1992) stellte in seinen Untersuchungen fest, daß der PAE bei Beta-Laktamantibiotika zeitlich identisch ist mit der Zeit zur Synthese neuer Penicillinbindenden-Proteine.

Bei der Bewertung der biologischen Bedeutung des Effektes muß berücksichtigt werden, daß noch zusätzlich eine sogenannte „postantibiotische Leukocytenfunktionsverstärkung“ eintritt. Hierunter versteht man, daß in der postantibiotischen Phase die exponierten Bakterien empfindlicher sind gegenüber der bakteriziden Einwirkung von menschlichen Leukocyten. Eine Erklärung für das Phänomen könnte die Veränderung der Zelloberfläche sein, so daß die Zelle empfänglicher wird für die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung oder bei Aminoglykosiden die reduzierte Proteinsynthese (Mackenzie et al. 1993, Spivey 1992).

Antibiotische Effekte werden auch in *subinhibitorischen Konzentrationen* beobachtet.

Exotoxin A, Exoenzyme, Phospholipase C, Elastase und die Gesamtprotease-Aktivität werden durch die Antibiotikakonzentrationen bis hinunter auf 1/20 des MHK-Wertes bei Ciprofloxacin, Tobramycin und Ceftazidim unterdrückt bei *Pseudomonas aeruginosa* (Dalhoff 1990).

Gerber (1993) stellte fest, daß der PAE verschiedener Antibiotika verlängert wird, wenn nach der primären PAE eine *sub-MHK*-Konzentration des Antibiotikums eingesetzt wird.

Für die klinische Relevanz bedeutet das eine ausreichende Konzentration im klinischen Dosierungsintervall. Während dieser Phase sind die meisten Penicillinbindenden-Proteine (PBP) noch inaktiviert, nachfolgend sind nur geringe Antibiotikakonzentrationen notwendig, um neue PBP zu hemmen. Es kommt zur vermehrten Hemmung der Zellvermehrung und damit zur Verlängerung des PAE (Bundtzen et al. 1981).

## 1.5 Aufgabenstellung

Der Gedanke für diese experimentelle Arbeit war es, den Postantibiotischen Effekt mit Konzentrationen der Antibiotika zu testen, die dem Serumspiegel entsprechen, um der in vivo-Situation nahe zu kommen. Die Untersuchungen zum PAE erfolgte mit klinischen Isolaten aus dem Bereich einer Intensivstation. Zahlreiche Ergebnisse zum Postantibiotischen Effekt in der Literatur beruhen auf Testungen von ATCC (American Type Culture Collection)-Stämmen. Ein wichtiger Gedanke für zukünftige Studien sollte die Durchführung von Testen mit klinischen Isolaten sein. Interessant ist auch die Fragestellung, was für ein PAE zeigt sich, wenn man Ceftazidim und Amikacin kombiniert, wie es täglich in der Klinik durchgeführt wird. Außerdem sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich der PAE nach mehreren Dosierungsintervallen entwickelt. Wie reagieren die Bakterien auf eine dreimalige Antibiotika-Exposition? Für die Therapie ist von Bedeutung, wie schnell die Wirkung eines Antibiotikums eintritt und wie lange diese anhält. Aus diesem Grund haben wir versucht mit unseren Untersuchungen die klinische Realität zu imitieren, d.h. alle 8-10 Stunden die Bakterienzelle erneut einem Antibiotikum auszusetzen. Das entspricht einer 3x täglichen Antibiotikagabe, wie sie bei Ceftazidim üblicherweise durchgeführt wird in Kombination mit einem Aminoglykosid.

Es sollte versucht werden, die klinische Situation mit experimentellen Untersuchungen nachzuahmen um Schlußfolgerungen für optimale Dosierungsintervalle ziehen zu können.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Bakterienstämme

Zur Testung des Postantibiotischen Effektes wurden 6 *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme mit verschiedenen Resistenzmuster verwendet. Es handelte sich dabei um 5 Stämme, die aus den oberen Atemwegen von Patienten der Intensivstation des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus stammten (Isolat-Nummern: 3, 17, 32, 623, 8536) und dem ATCC 27853-Stamm. Die MHK der Patientenstämme zeigt Unterschiede in der Sensibilität gegenüber den beiden getesteten Antibiotika. Der Stamm 623 zeigte sich kulturell als Rauform.

Die Bakterienstämme wurden bei minus 21°C eingefroren und vor jedem Testansatz auf Mac Conkey Agar rekultiviert.

### 2.2 Nährmedien

Verwendet wurden Mac Conkey Agar (OXOID Artikel-Nummer: CM 115) und Müller Hinton Bouillon (MERCK Artikel-Nummer: 1.05396.0500).

Die Herstellung erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller.

## 2.3 Antibiotika

Es erfolgte die Testung mit Amikacin, Ceftazidim und Amikacin plus Ceftazidim in einmaliger Exposition und mehrmaliger Exposition.

Amikacin wurde von der Firma BRISTOL-MYERS SQUIBB und Ceftazidim von der Firma CASCA verwendet.

Die Amikacin-Reinsubstanz wurde in sterilem Aqua dest. gelöst und auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml nach Firmenvorschrift eingestellt.

Ceftazidim wurde unter Zugabe von Natrium-Carbonat in destilliertem Wasser gelöst und dabei auf eine Endkonzentration von 40 µg/ml laut Firmenvorschrift eingestellt.

Beide Konzentrationen entsprechen den Serumspiegelkonzentrationen (Baltch et al. 1996, Hostacka 1996, Sturm 1989).

Die Lagerung erfolgte bei minus 20°C, da Gupta et al. (1988) zeigen konnten, daß die Substanzen über 90 Tage bei Lagerungstemperaturen von minus 20°C stabil blieben .

## 2.4 MHK-Bestimmung

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (angegeben in µg/ml bzw. mg/l), bei der unter definierten invitro-Bedingungen die Vermehrung von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert wird.

Als Vorversuch erfolgte die MHK-Bestimmung mit der Bouillondilutionsmethode bei allen eingesetzten Teststämmen nach DIN 58940. Hierfür wurden Mikrotiterplatten verwendet, die im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum der Charité hergestellt wurden.

Von einer 18 h alten Agarkultur (Mac Conkey) der Pseudomonas-Stämme wurde eine Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt (McFarland 0,5 mittels Densitometer bestimmt), die einer Koloniezahl von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  vermehrungsfähigen Keimen je ml entsprach. In jede Kavität, die mit einem definiertem Wirkstoffgehalt der Antibiotikastammlösung (siehe Tabelle 1) bestückt war, wurden 10 µl pro Kavität der Bakterienkultur pipettiert. Danach wurden die Platten 18 h bei 37 °C bebrütet. Zur Auswertung wurde ein makroskopisch sichtbares Wachstum des Inokulums registriert. Zur Beurteilung sind die MHK-Werte den nach DIN 58940 Teil 4 festgelegten Bewertungsstufen „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ zugeordnet worden.

Tabelle 1 Pipettierschema zur MHK-Bestimmung auf einer Mikrotiterplatte mit folgenden Antibiotikakonzentrationen (in mg/l)

Antibiotikum	Konzentration in mg/l										Antibiotikum		
Ampicillin	16	8	4	2	1	64	32	16	8	4	2	Positiv-kontrolle	Piperacillin
Ampicillin/Sulbactam	16	8	4	2	1	64	32	16	8	4	2	1	Piperacillin/Tazobactam
Mezlocillin	32	16	8	4	2	128	64	32	16	8	4	2	Azlocillin
Ciprofloxac	4	2	1	0,5	0,25	32	16	8	4	2	1	0,5	Meropenem
Doxycyclin	8	4	2	1	0,5	16	8	4	2	1	0,5	0,25	Cefotiam
Gentamicin	8	4	2	1	0,5	16	8	4	2	1	0,5	0,25	Cefotaxim
Tobramycin	8	4	2	1	0,5	32	16	8	4	2	1	0,5	Ceftazidim
Amikacin	32	16	8	4	2	128	64	32	16	8	4	Negativ-kontrolle	Trimethopr/Sulfonamid

Resistent	Intermediär	Sensibel
-----------	-------------	----------

## 2.5 MBK-Bestimmung von Amikacin

Die minimale bakterizide Konzentration (MBK) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (angegeben in µg/ml bzw. mg/l), die unter in vitro-Bedingungen ein definiertes Inokulum von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne um > 99,9 % abtötet.

Von einer 18 h alten Bouillonkultur der stationären Wachstumsphase wurde eine Verdünnung in Müller-Hinton-Bouillon hergestellt, die einer Koloniezahl von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  vermehrungsfähigen Keimen je ml entsprach. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Amikacin-Stammlösung hergestellt mit je 1 ml Volumen pro Röhrchen. Folgende Endkonzentrationen an Amikacin wurden pro Röhrchen eingegeben: 8, 10, 16, 20, 32, 40, und 80 µg/ml. Jedem Röhrchen wurden 1 ml des Inokulum (Bakterienkultur) zugefügt. Danach wurden die Teströhrchen 18 h bei 37 °C bebrütet und anschließend die Röhrchen ohne Trübung auf Nährböden (Mac Conkey) in einer logarithmischen Verdünnungsreihe überimpft, um eventuell Wachstum, das keine Trübung mehr hervorruft, zu erkennen. Eine Wachstumskontrolle lief parallel ohne Amikacinzusatz.

## 2.6 Bakterizidiekurven

Die bakterizide Wirkung kann auch in Form von Zeit-Abtötungskurven dargestellt werden. Dabei wird das Inokulum mit dem antibakteriellen Wirkstoff inkubiert und nach festgelegten Zeitintervallen hiervon Teilmengen auf die Anzahl lebender Zellen untersucht.

Von den oben erwähnten 6 Stämmen wurde ein Inokulum von  $10^6$  bis  $10^7$  in physiologischer Kochsalzlösung mittels Densitometer hergestellt (McFarland 0,5). Die genaue Bestimmung erfolgte retrospektiv über eine Verdünnungsreihe (geometrische Schritte 1:10 verdünnt), von der jeweils 100 µl auf antibiotikafreien Agarplatten (Mac Conkey) ausgestrichen wurden.

Die Röhren mit einem Gesamtvolumen von 5 ml (0,5 ml Antibiotikastammlösung und 4,5 ml Keimsuspension) wurden bei 37°C für 10 Stunden bebrütet. Als Antibiotikakonzentration wurden die MHK der Teststämme und die Serumspiegelkonzentration beider Antibiotika als Endkonzentration eingesetzt. Die Ansätze liefen jeweils als alleinige Zugabe von Amikacin und Ceftazidim und als Kombination beider. Alle 1 bis 2 Stunden wurden je 100 µl entnommen, in 1:10 Schritten verdünnt und auf antibiotikafreien Agarplatten ausgestrichen. Es wurde eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikalösung unter gleichen Bedingungen mitgetestet. Nach 18stündiger Inkubation wurden die Kolonien gezählt und in halblogarithmischen Diagrammen die KBE/ml (Koloniebildende Einheiten) gegen die Zeit aufgetragen.

## 2.7 Fotografische Darstellung

Die Bakterien wurden bei einer 100fachen Vergrößerung mittels eines „Nikon“-Mikroskop fotografiert (Film APX100). Zusätzlich sind Bilder im Elektronenmikroskop (TESLA, BP 5000) entwickelt worden. Dazu wurden aus einer Keimbouillon (Müller-Hinton), die mit dem entsprechenden Antibiotikum und dem ATCC-27835 Stamm über 2 Stunden inkubiert war,

2 µl auf ein Kohlefilm beschichtetes Kupfernetz aufgebracht. Danach erfolgte eine 3malige Waschprozedur mit Aqua dest. und anschließend die Kontrastierung mit 2%igen Uranylacetat. Nachfolgend konnten die Netze im Elektronenmikroskop betrachtet werden. Fotografiert wurde mittels einfachen Fotoplatten, welche ein Fotolabor entwickelte .

Außerdem erfolgte eine Darstellung einer inkubierten Bakteriensuspension mit Amikacin durch die Firma LEICA mittels Rasterelektronenmikroskopie.

## 2.8 Bestimmung des Postantibiotischen Effektes

Von einer Agarplatte wurden 3-5 Kolonien in 60 ml Müller-Hinton-Bouillon überimpft und für 20 Stunden bei 37°C bebrütet (stationäre Phase). Daraus wurden 6 ml Flüssigkultur in vorgewärmte Müller-Hinton-Bouillon überführt und für 3 Stunden bei 37°C auf einem Magnetrührer in die logarithmische Wachstumsphase gebracht.

Für die PAE-Bestimmung wurde ein Inokulum von  $10^6$ - $10^7$  KBE/ml benötigt. Diese Keimkonzentration wurde aus der zuletzt beimpften Bouillon gewonnen mittels McFarland-Bestimmung über ein Densitometer und Kontrolle dessen über eine Lebend-Keimzahlbestimmung mittels Verdünnungsreihe.

Es liefen pro Ansatz 2 Testreihen und eine Wachstumskontrolle.

In den Teströhren befanden sich bei der Ceftazidimtestung 4,5 ml Pseudomonas aeruginosa-Flüssigkultur mit dem definierten Inokulum (Mac Farland 0,5) plus 0,5 ml Ceftazidim 40 µg/ml, bei der Amikacintestung 4,5 ml Flüssigkultur plus 0,5 ml Amikacin 20 µg/ml und bei der Kombinationstestung 4,0 ml Pseudomonas aeruginosa-Flüssigkultur plus 0,5 ml Amikacin 20 µg/ml plus 0,5ml Ceftazidim 40 µg/ml.

In der Wachstumskontrolle waren bei jeder Testung stets 5,0 ml Flüssigkultur von Pseudomonas aeruginosa (Mac Farland 0,5) ohne Antibiotikazusätze.

Die Expositionszeit betrug immer 2 Stunden bei 37°C auf einem Rüttler.

Vor Testbeginn wurde aus allen Ansatzröhren das Inokulum retrospektiv durch Ermittlung der Lebend-Keimzahl bestimmt. Die Keimzählung erfolgte durch Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe und nachfolgendem Spatelverfahren (100 µl pro Agarplatte), die Auswertung aus den 3 mittleren Verdünnungsstufen, wobei das arithmetische Mittel gebildet wurde.

Nach den 2 Stunden Exposition wurde die Keimzahl bestimmt (siehe oben). Danach wurden die Röhrchen 10 min bei 3000 g und 37°C zentrifugiert, und der Überstand bis auf 1 ml entfernt. Diese 1 ml wurden in 9 ml frischer Müller-Hinton-Bouillon resuspendiert mit nachfolgender Zentrifugation und Resuspendierung von 0,5 ml Aliquot in 4,5 ml frischer Müller-Hinton-Bouillon. Diese Waschprozedur fand zweimal statt. Der frische Ansatz wurde für 8-10 Stunden bei 37°C bebrütet und alle 1-2 Stunden eine Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung angelegt. Aus dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgespatelt, für 18 Stunden bei 37°C bebrütet und nachfolgend ausgezählt.

Gleichzeitig erfolgte die Überprüfung auf antibakterielle Hemmstoffe, das heißt eine Testung dahingehend ob sich noch Reste von Antibiotika in der Testlösung befinden. Methodisch vorgegangen wurde nach DIN 58958 Teil 1.

Zur Auswertung wurde die Keimzahl KBE/ml logarithmisch gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Aus diesem ließ sich dann der Postantibiotische Effekt bestimmen. Der PAE wurde durch Vergleich der Wachstumskurven von der Testung mit Antibiotikum und der Negativkontrolle ohne Antibiotika-Exposition ermittelt. Der PAE wird in Stunden und Minuten angegeben.

Die Bestimmung des Postantibiotischen Effektes wurde in 3 bis 10 Parallelansätzen bestimmt.

Die Untersuchungen zum Postantibiotischen Effekt wurden in einer einmaligen Exposition (siehe Abbildung 1) und in einer dreimaligen Exposition (siehe Abbildung 2) durchgeführt. Dabei wurde die Antibiotikaexposition nach 8-10 Stunden und nach weiteren 8-10 Stunden wiederholt. Jede einzelne Expositionsphase zeigte den gleichen methodischen Ablauf wie oben beschrieben.

Abb.1 Grafische Darstellung zur Ermittlung des PAE bei einmaliger Exposition (Prinzip)

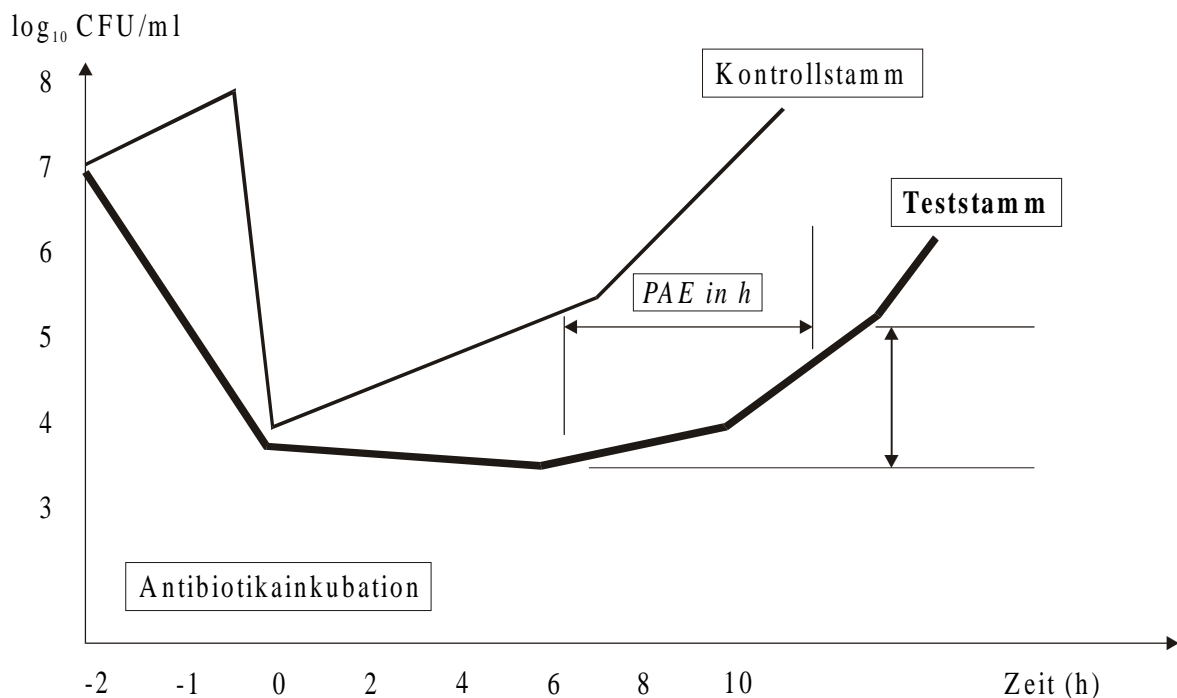
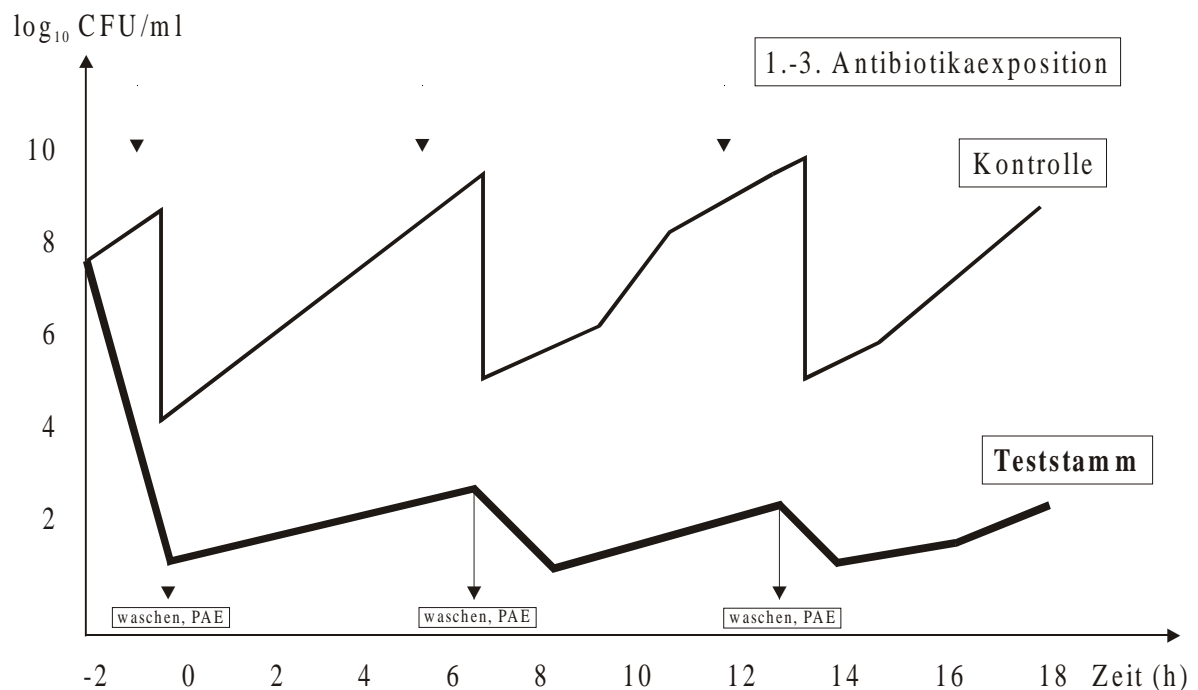


Abb.2 Ablauf der PAE-Bestimmung bei Mehrfach-Exposition (Prinzip)



### 2.8.1 Statistische Berechnung

Berechnet wurde die Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe. Die Standardabweichung ist ein Maß dafür, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert streuen.

Die Stichprobenstandardabweichung (STABW) verwendet folgende Formel:

$$STABW = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

x = Einzelmeßwert

n = Anzahl der Meßwerte

### 2.8.2 Quantifizierung des Postantibiotischen Effektes

Unter dem Postantibiotischen Effekt versteht man die Hemmung einer erneuten Keimvermehrung in Stunden nach kurzfristiger Antibiotikaexposition bei einem mehrfachen der MHK (siehe Abbildung 1 und 2).

Die Dauer des Postantibiotischen Effektes wurde errechnet nach der Gleichung:

$$PAE = 1 \log_{10} \text{ Test} - 1 \log_{10} \text{ Wachstumskontrolle}$$

$$PAE = T - C \text{ (in Stunden)}$$

wobei  $1 \log_{10}$  Test die Zeit darstellt, die die vorexponierten Keime benötigen, um sich zu verzehnfachen;  $1 \log_{10}$  Wachstumskontrolle ist die Verzehnfachungszeit der scheinexponierten Kontrollorganismen (Gerber et al. 1982).

### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 MHK der Teststämme

Die Werte der MHK-Bestimmungen sind in Tabelle 2 aufgeführt und stellen Mittelwerte von Untersuchungsabläufen dar.

Die Patientenstämme zeigten eine unterschiedliche antimikrobielle Empfindlichkeit. Stamm 623 und 8536 sind relativ sensible Isolate. Stamm 3 und 17 zeigen eine geringe Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Antibiotika.

Die höchste Resistenz zeigte Stamm 32 mit sieben Antibiotika. Nur Ceftazidim war sensibel (siehe Tabelle 2 und 3).

Solche Resistenzmuster sind oft bei *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten einer Intensivstation zu finden.

Tabelle 2 MHK von 8 Antibiotika gegen sechs Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* (Angaben in  $\mu\text{g/ml}$ )

Antibiotikum	Pseudomonas aeruginosa-Stämme					
	ATCC 27853	623	8536	3	17	32
Ciprofloxacin	<0,25	<0,25	<0,25	0,5	<0,25	0,5
Gentamycin	1	1	1	4	2	>8
Tobramycin	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	<0,5	4
Amikacin	2	<2	2	4	2	32
Piperacillin	4	2	4	16	8	64
Cefotaxim	4	4	16	16	>16	>16
Ceftazidim	1	<0,25	2	2	2	4
Mezlocillin	16	16	32	>32	>32	>32

Tabelle 3 MHK-Bewertung für Amikacin und Ceftazidi

Stamm	Amikacin	Ceftazidi
ATCC 27853	sensibel	sensibel
623	sensibel	sensibel
17	sensibel	sensibel
3	sensibel	sensibel
8536	sensibel	sensibel
32	resistent	sensibel (letzte Stufe)

### 3.2 Minimale Bakterizide Konzentration (MBK) gegen Amikacin

Die Bestimmung der MBK für Amikacin ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Ergebnisse sind aus 3 Parallelbestimmungen hervorgegangen. Ermittlung nach der beschriebenen Methode unter Punkt 2.5 .

Die höchste Resistenz zeigte Stamm 32, die niedrigste die Stämme 17 und 8536.

Tabelle 4 MBK von Amikacin gegen die sechs Teststämme

Anti- biotika- konzentration	Keimzahl KBE/ml					
	Stamm ATCC	Stamm 623	Stamm 17	Stamm 3	Stamm 8536	Stamm 32
	Inokulum $4 \times 10^6$	Inokulum $1 \times 10^7$	Inokulum $1,75 \times 10^6$	Inokulum $8 \times 10^6$	Inokulum $1 \times 10^6$	Inokulum $1 \times 10^7$
8 µg/ml	$5,0 \times 10^3$	k.M.	k.M.	k.M.	k.M.	k.M.
10 µg/ml	k.M.	k.M.	$1,75 \times 10^3$	k.M.	$1,0 \times 10^2$	k.M.
16 µg/ml	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	k.M.	$8,0 \times 10^3$	k.M.	k.M.
20 µg/ml	k.M.	k.M.	negativ	k.M.	negativ	k.M.
32 µg/ml	$1,0 \times 10^2$	negativ	negativ	$1,0 \times 10^3$	negativ	$1,0 \times 10^3$
40 µg/ml	negativ	k.M.	negativ	negativ	k.M.	$1,0 \times 10^3$
80 µg/ml	negativ	negativ	k.M.	negativ	negativ	negativ

k.M. = kein Meßwert

Zusammengefaßt ergeben sich hieraus folgende MBK-Werte gegen Amikacin:

Stamm ATCC                    40 µg/ml

Stamm 623                    32 µg/ml

Stamm 17	20 µg/ml
Stamm 3	40 µg/ml
Stamm 8536	20 µg/ml
Stamm 32	80 µg/ml

### 3.3 Bakterizidiekurven

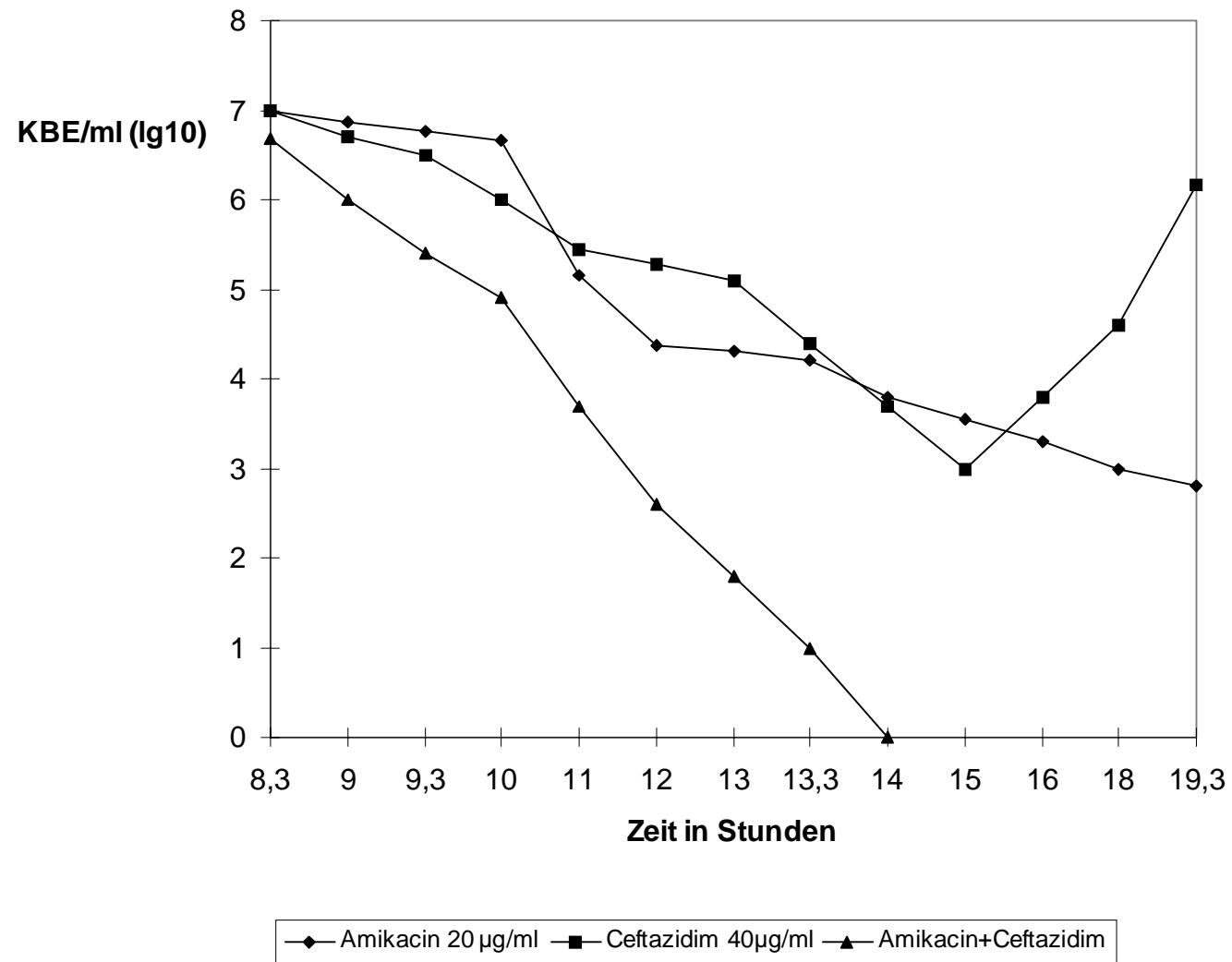
Die Bakterizidiekurven (Methodenbeschreibung siehe unter Gliederungspunkt 2.6) zeigen die geringe Wirksamkeit der Antibiotika in MHK-Größen auf die Bakterien

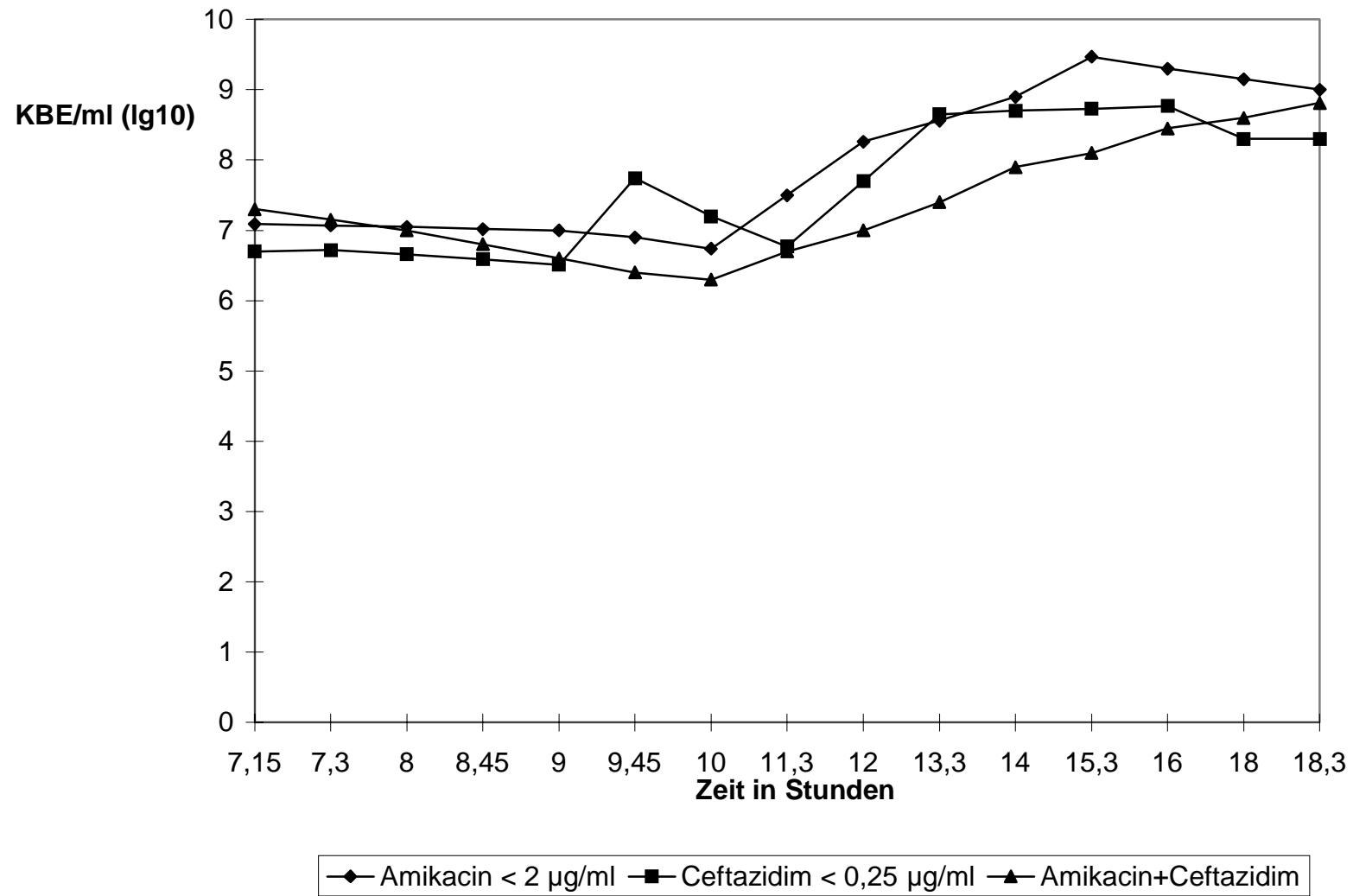
Aus den Kurvenverläufen (Abb. 3 bis Abb. 14), welche sich an dieses Kapitel anschließen, ist erkennbar, daß die effektivste Wirkung auf die Bakterien nur durch den Einsatz der Serumspiegelkonzentration zu verzeichnen ist.

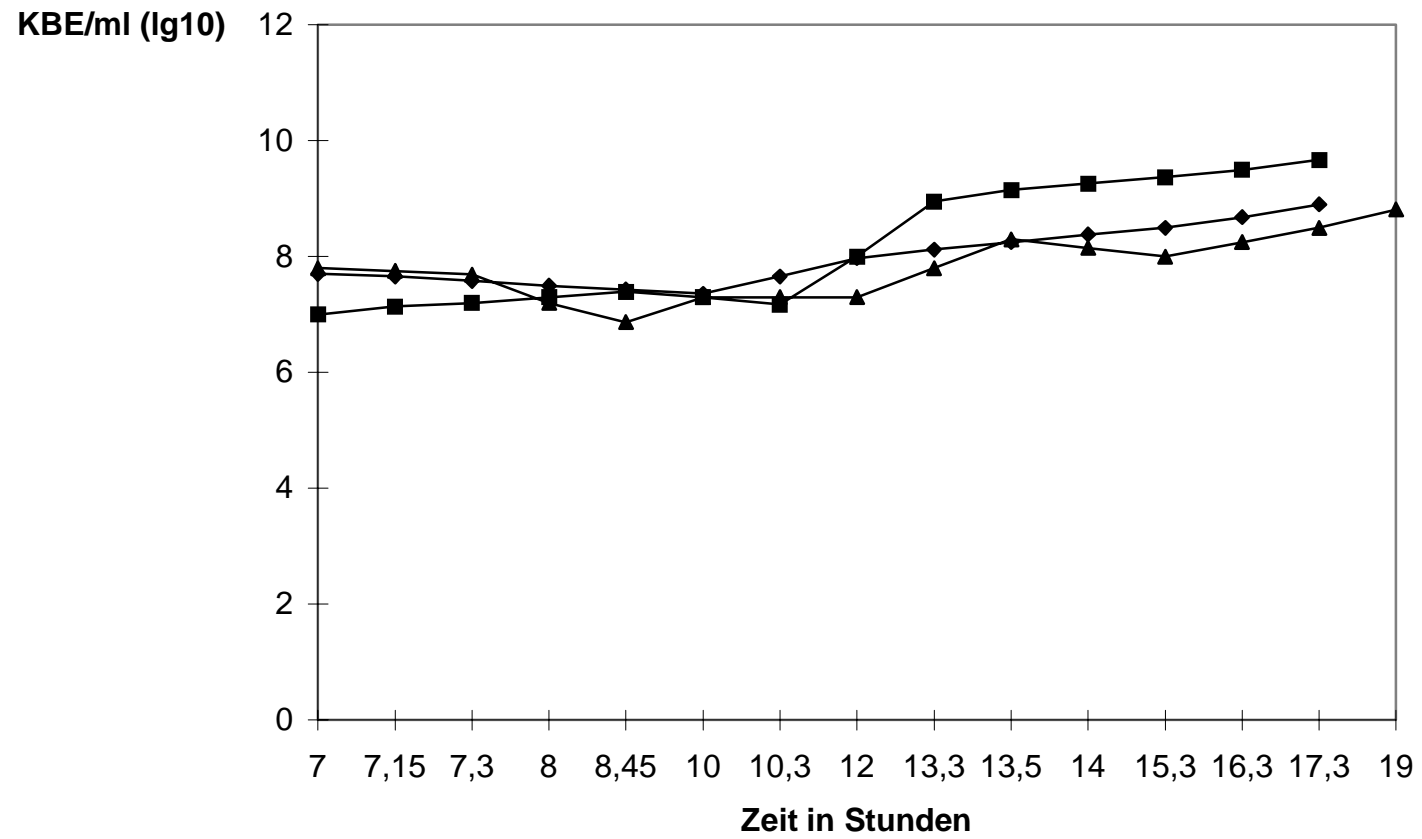
Der Stamm 32 ist gegenüber Amikacin resistent, aber mit der Konzentration von 20 µg/ml ist eine bakterizide Wirkung sichtbar (Abb.13).

Bei der Kombination beider Antibiotika ist eine deutliche Verstärkung der antibakteriellen Wirksamkeit zu erkennen.

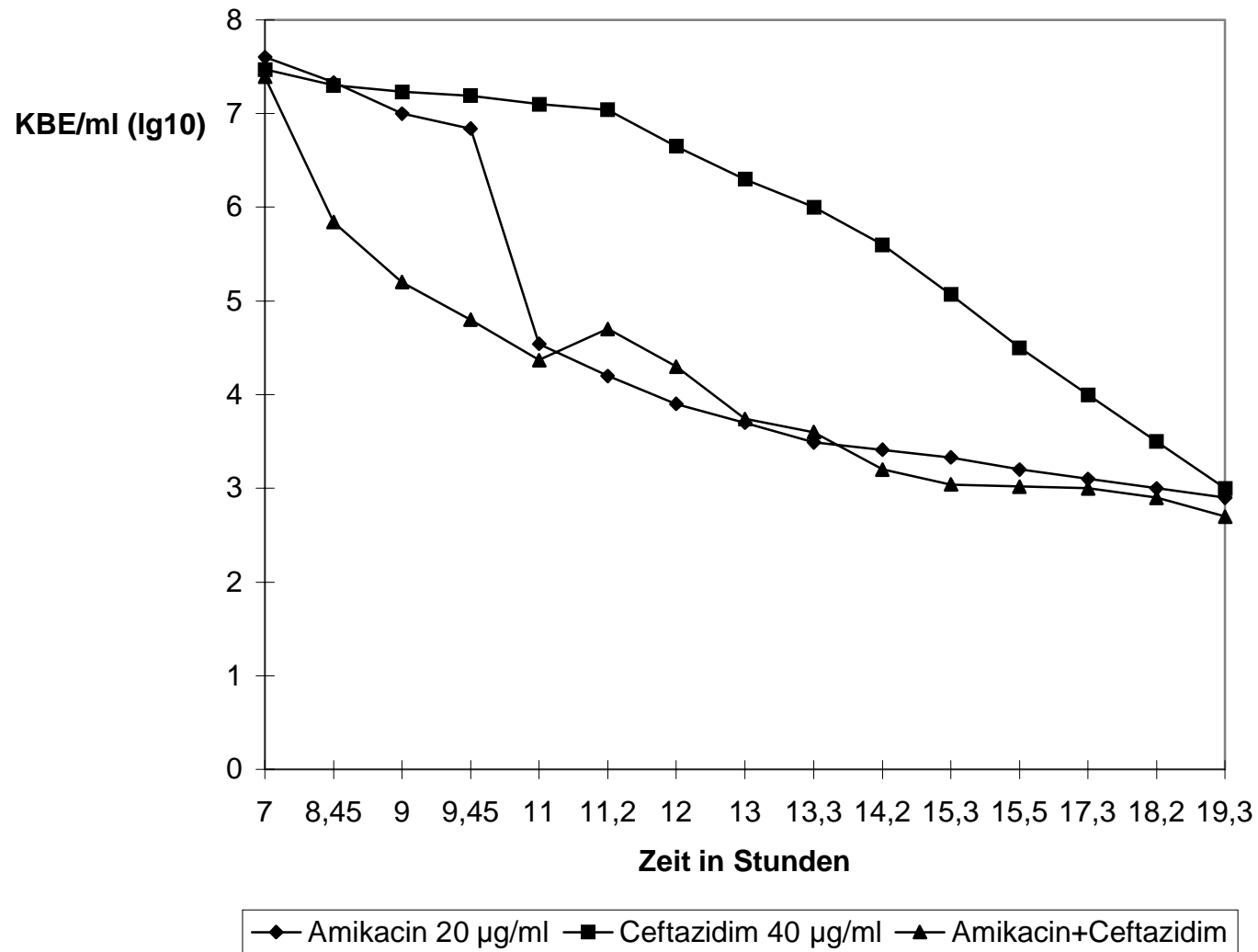
Hinweis zu den Grafiken: die Minimalen Hemmkonzentrationen der einzelnen Teststämme sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Serumspiegelkonzentration von Amikacin entsprach 20 µg/ml und die von Ceftazidim 40 µg/ml.

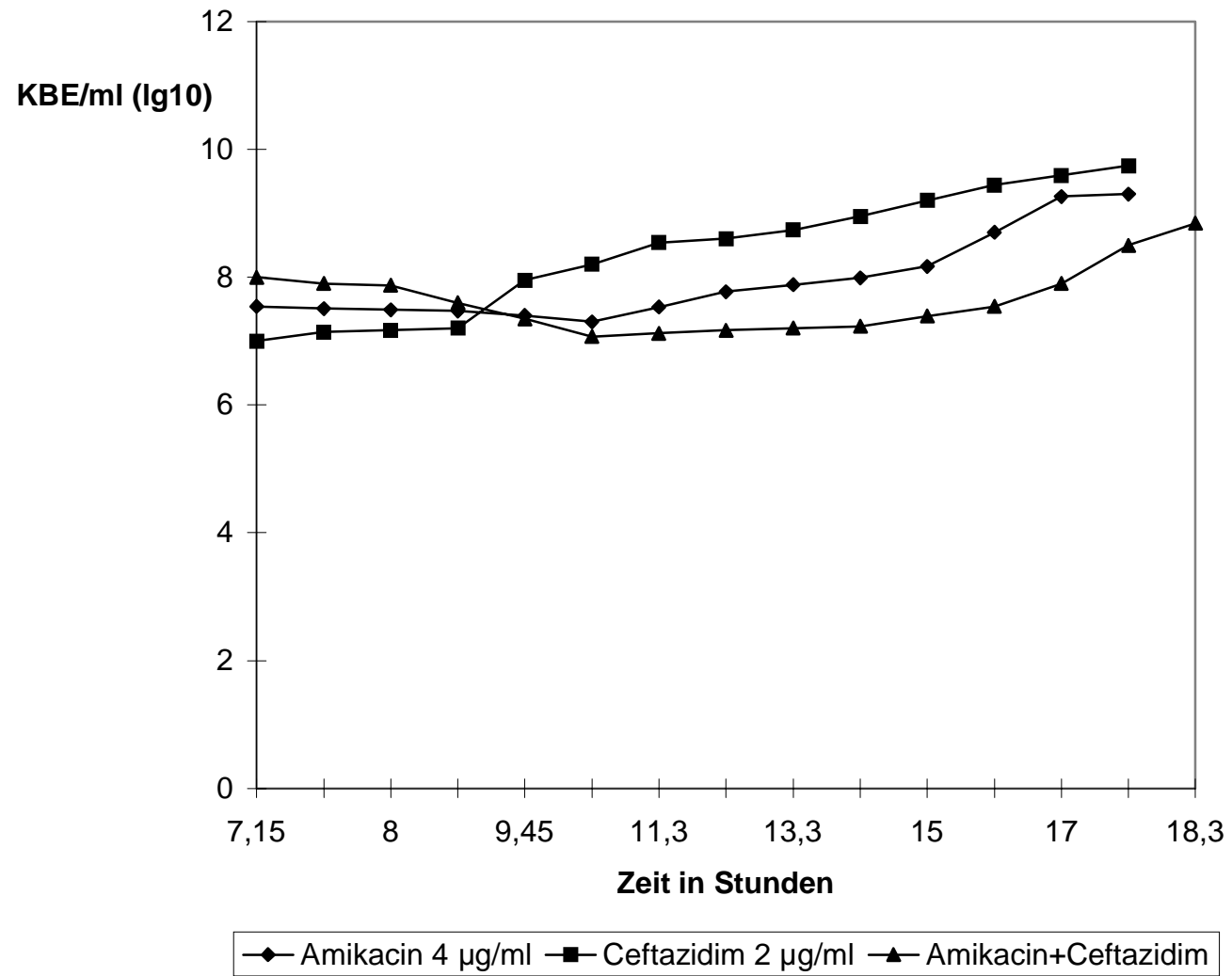
**Abb. 3** Bakterizidiekurven vom Stamm 623 mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika

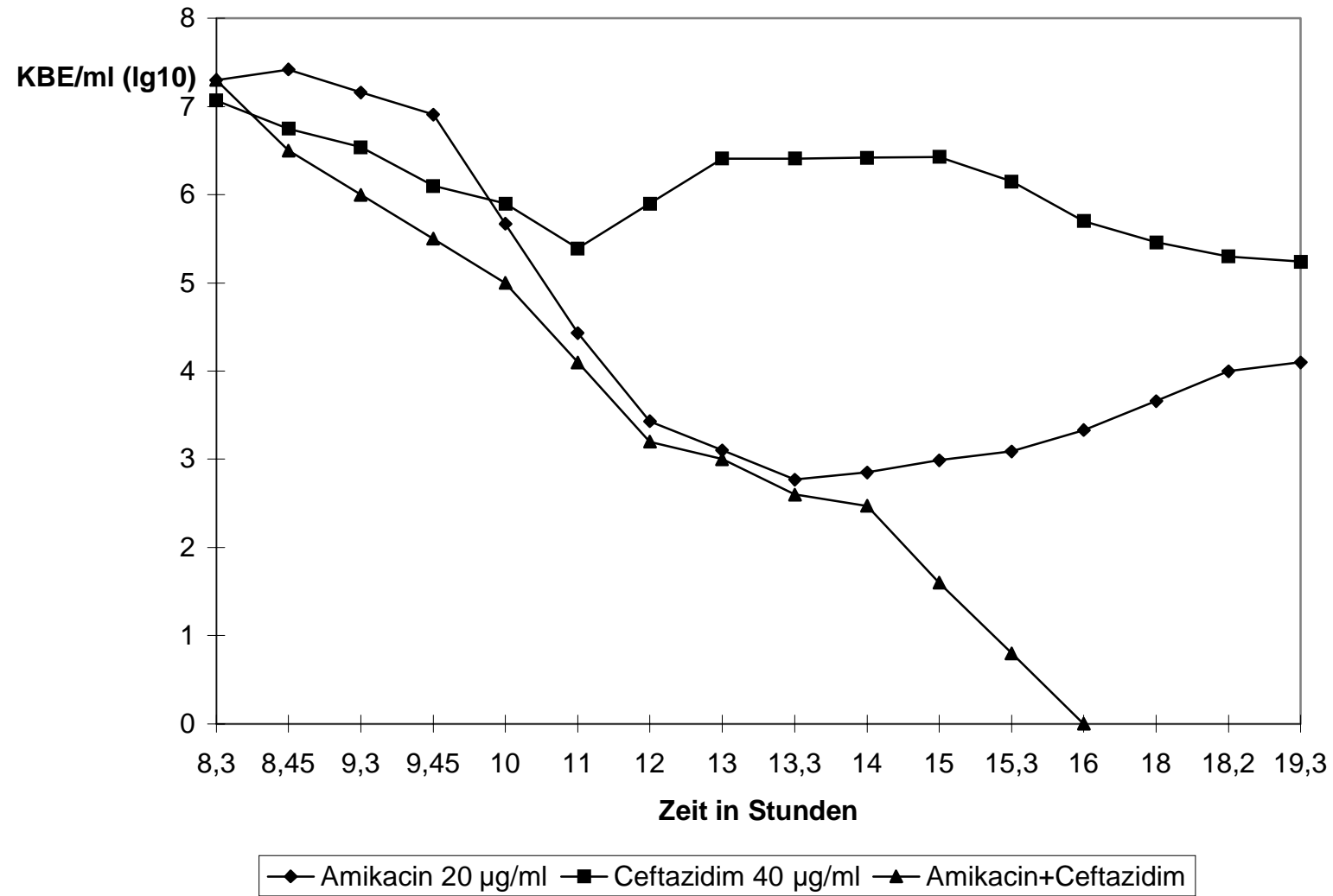
**Abb. 4** Bakterizidiekurven vom Stamm 623 mit MHK der Antibiotika

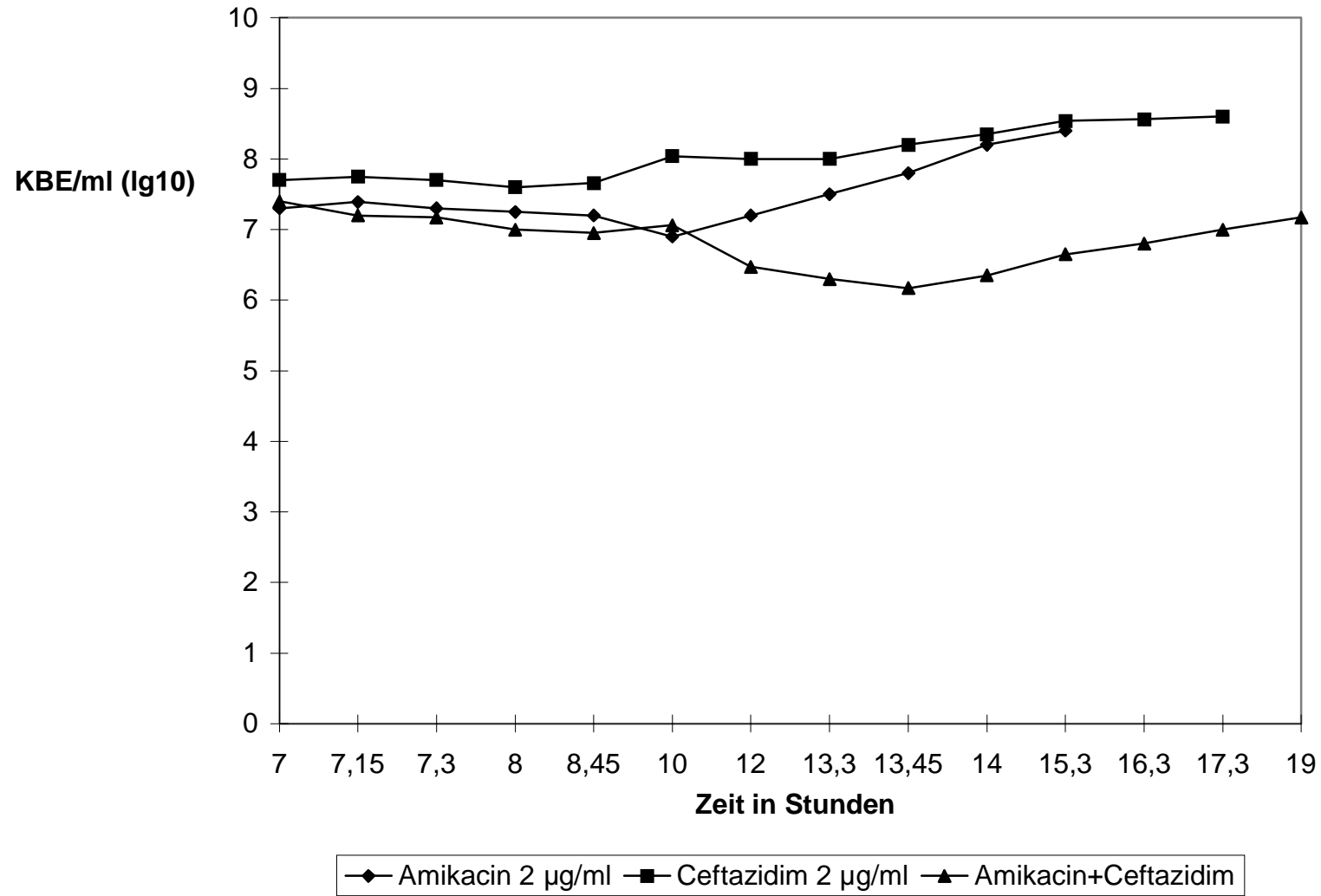
**Abb.5** Bakterizidiekurven von Stamm 17 mit MHK der Antibiotika

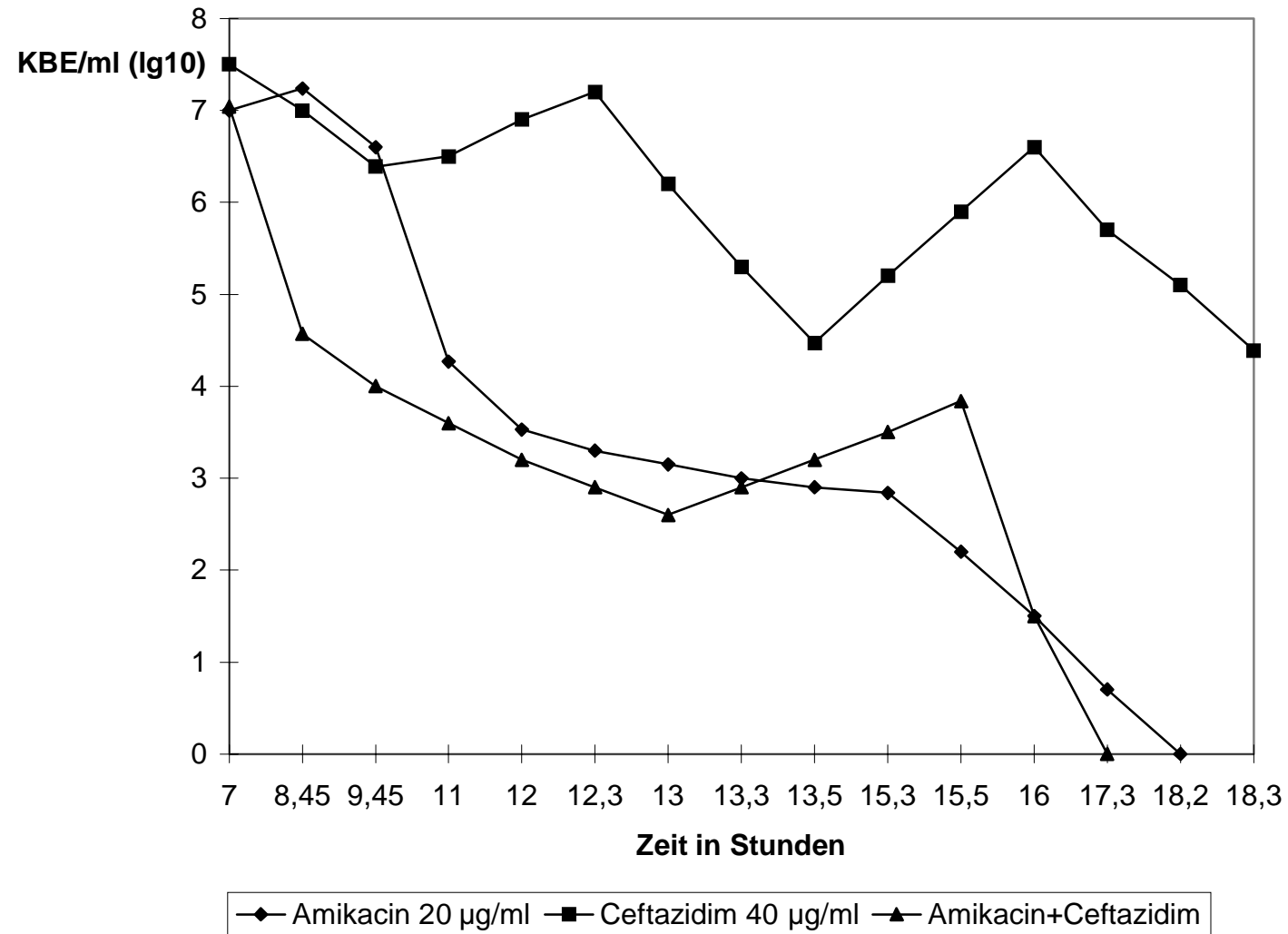
—◆— Amikacin 2 µg/ml —■— Ceftazidim 2 µg/ml —▲— Amikacin+Ceftazidim

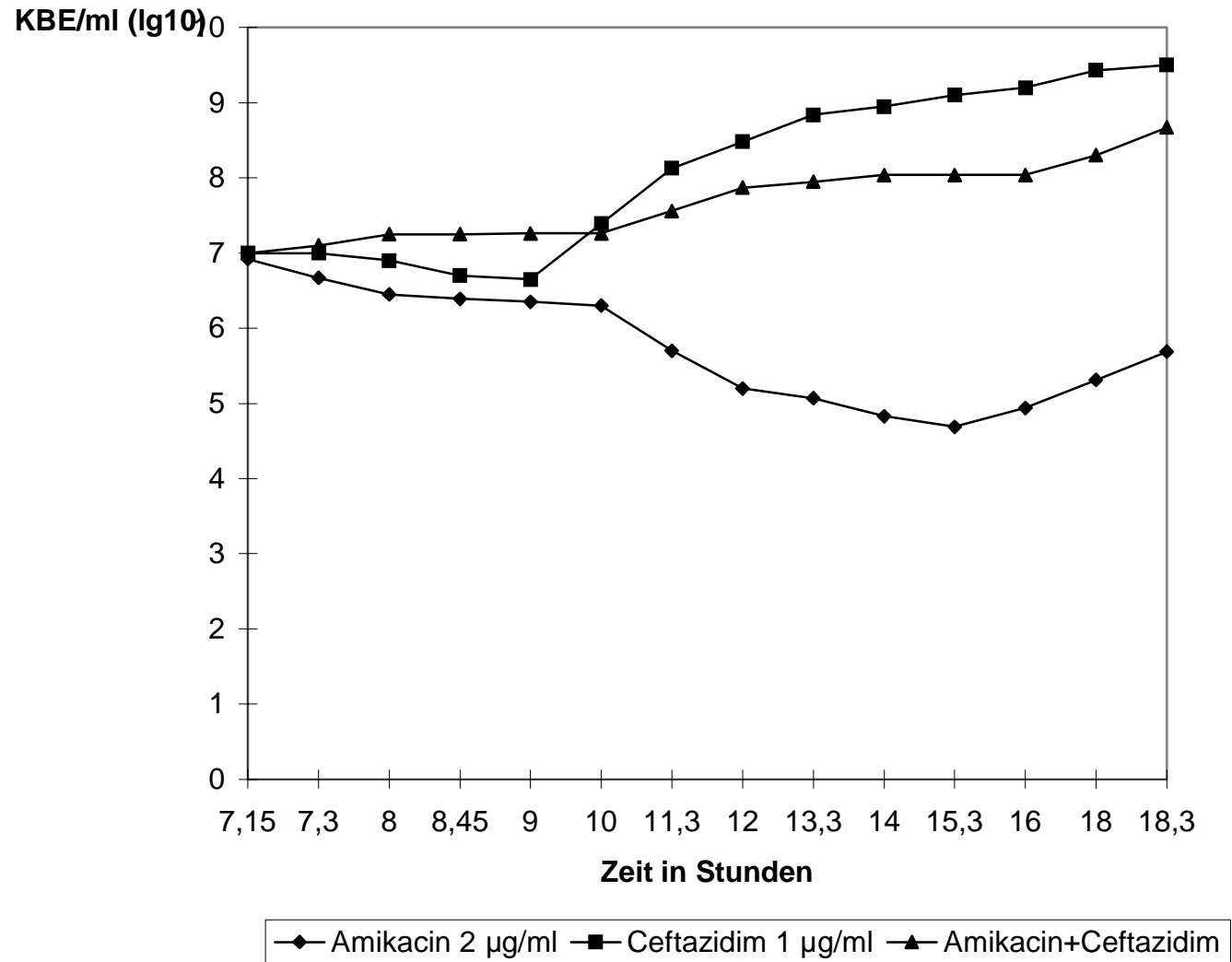
**Abb. 6** Bakterizidiekurven vom Stamm 17 mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika

**Abb. 7** Bakterizidiekurven vom Stamm 3 mit MHK der Antibiotika

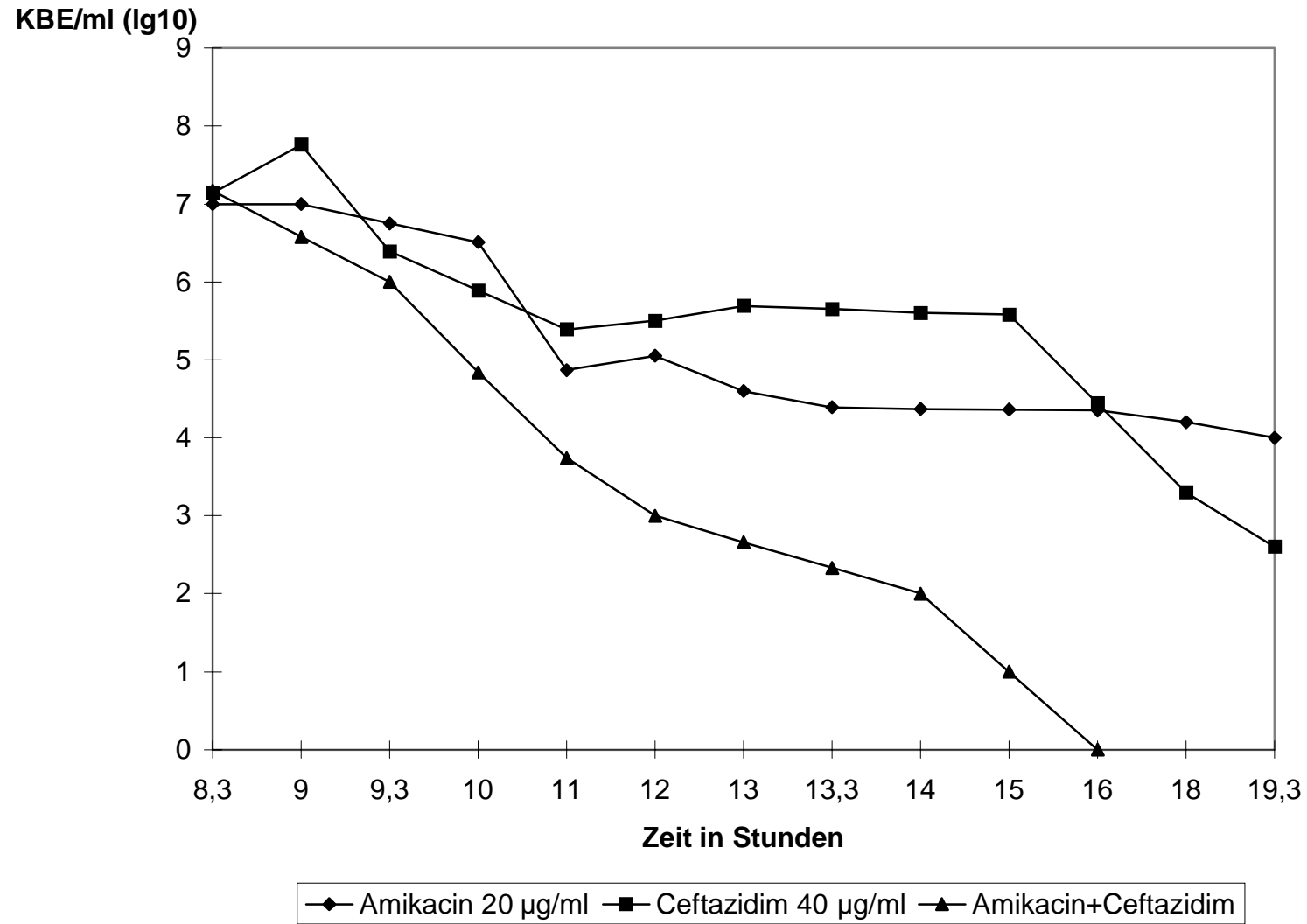
**Abb. 8** Bakterizidiekurven vom Stamm 3 mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika

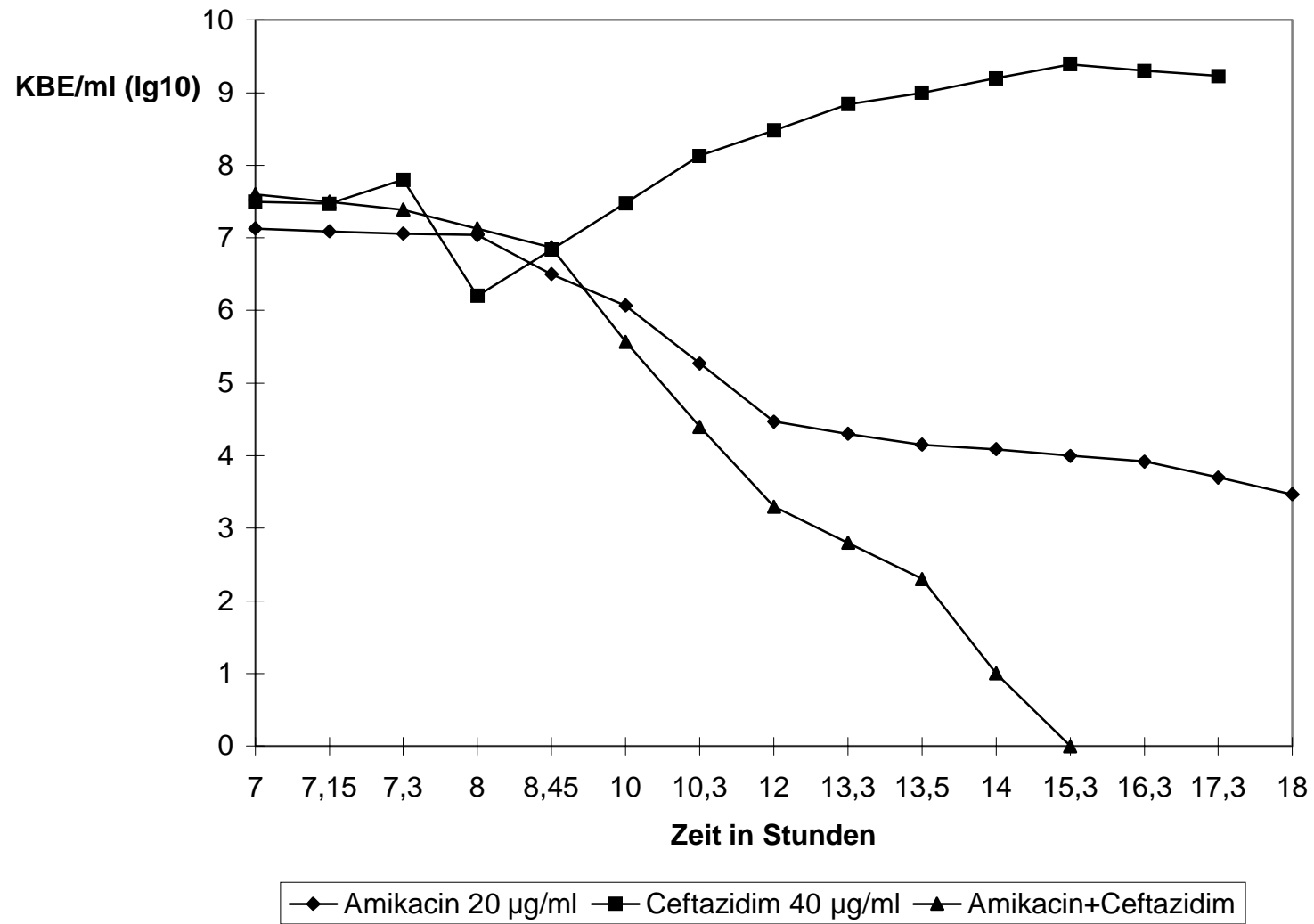
**Abb. 9** Bakterizidiekurven von Stamm 8536 mit MHK der Antibiotika

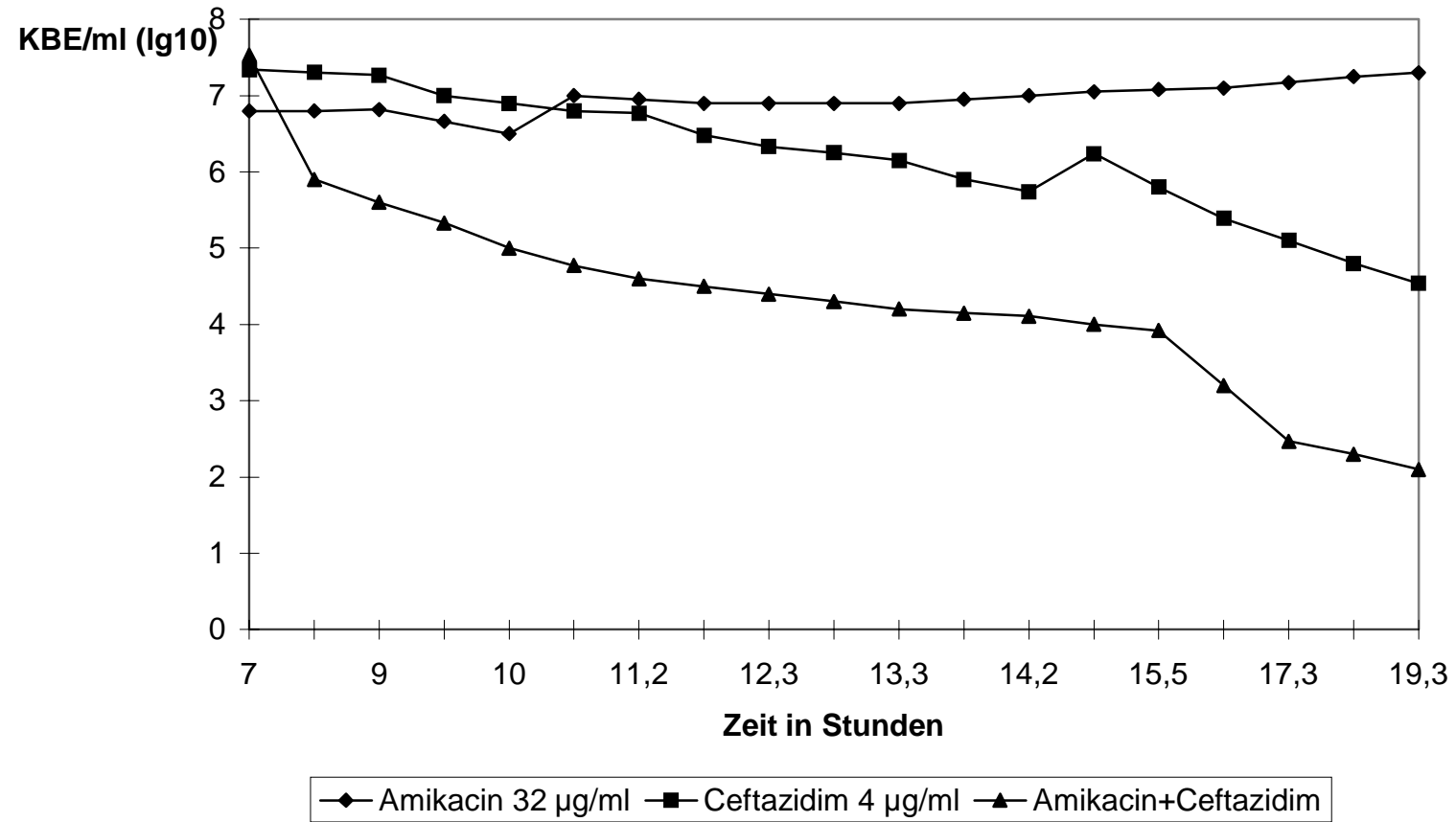
**Abb. 10** Bakterizidiekurven von Stamm 8536 mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika

**Abb.11** Bakterizidiekurven vom Stamm ATCC 27853 mit MHK der Antibiotika

**Abb. 12** Bakterizidiekurven vom Stamm ATCC mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika



**Abb. 13** Bakterizidiekurven vom Stamm 32 mit Serumspiegelkonzentration der Antibiotika

**Abb. 14** Bakterizidiekurven vom Stamm 32 mit MHK der Antibiotika

### 3.4 Postantibiotischer Effekt mit einmaliger Exposition von Amikacin, Cefprozid und die Kombination beider Antibiotika

#### 3.4.1 PAE bei Amikacin

Alle 5 Patientenstämme und der ATCC-Stamm wurden bezüglich des PAE gegenüber Amikacin geprüft bei einer Konzentration von 20 µg/ml.

Die Testung erfolgte 10 mal (Stamm 32: 6 mal), um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen und statistische Werte erheben zu können. Das Inokulum schwankte zwischen  $0,5 \times 10^7$  bis  $3,75 \times 10^7$  KBE/ml. Die Expositionszeit des Antibiotikums betrug 2 Stunden. Die Wirksamkeit von Amikacin über diese Zeit spiegelt sich in einer Verringerung der Keimkonzentration um 3-4 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml) wieder. Das Wachstum der Bakterien nach Amikacin-Kontakt wurde über 10 Stunden registriert.

Der Stamm 8536 besitzt einen durchschnittlichen Postantibiotischen Effekt von 1,6 Stunden bei einem Inokulum von  $1,9 \times 10^7$  KBE/ml (Mittelwert).

Der Stamm 623 besitzt einen durchschnittlichen Postantibiotischen Effekt von 2,3 Stunden bei einem mittleren Inokulum von  $1,57 \times 10^7$  KBE/ml. Beide Stämme gelten als relativ sensibel in der MHK-Bestimmung und zeigen trotzdem Unterschiede beim Postantibiotischen Effekt von 0,7 h.

Stamm 3 und 17 mit ähnlichem Resistenzmuster in der MHK-Bestimmung zeigen eine Differenz im Postantibiotischen Effekt von 0,6 h.

Der Stamm 32 besitzt gegenüber Amikacin keinen PAE bis negativen PAE.

Die Standardabweichung bei allen Testabläufen lag zwischen 0,13 und 0,78 h.

**Tabelle 5** Bestimmung des PAE in Gegenwart von Amikacin (20 µg/ml) bei den Teststämmen

	<b>Stamm 3</b>		<b>Stamm 8536</b>		<b>Stamm 17</b>		<b>Stamm 32</b>		<b>Stamm 623</b>		<b>ATCC 27853</b>	
	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>	<b>Inokulum KBE/ml</b>	<b>PAE in Stunden</b>
	1,7x10 <sup>7</sup>	2,5	1,0x10 <sup>7</sup>	2,5	1,0x10 <sup>7</sup>	2,0	2,75x10 <sup>7</sup>	-0,25	1,0x10 <sup>7</sup>	3,0	0,5x10 <sup>7</sup>	2,0
	1,5x10 <sup>7</sup>	2,5	0,65x10 <sup>7</sup>	2,5	0,65x10 <sup>7</sup>	1,75	3,4x10 <sup>7</sup>	-0,25	1,4x10 <sup>7</sup>	2,75	0,7x10 <sup>7</sup>	3,0
	0,5x10 <sup>7</sup>	1,5	1,1x10 <sup>7</sup>	1,0	0,48x10 <sup>7</sup>	3,0	2,7x10 <sup>7</sup>	0	1,6x10 <sup>7</sup>	1,75	0,85x10 <sup>7</sup>	2,0
	1,0x10 <sup>7</sup>	1,0	1,0x10 <sup>7</sup>	1,25	0,58x10 <sup>7</sup>	3,5	3,75x10 <sup>7</sup>	0	2,0x10 <sup>7</sup>	1,5	0,7x10 <sup>7</sup>	2,0
	2,8x10 <sup>7</sup>	2,0	3,2x10 <sup>7</sup>	1,5	3,0x10 <sup>7</sup>	3,0	2,0x10 <sup>7</sup>	0	2,0x10 <sup>7</sup>	2,0	0,64x10 <sup>7</sup>	2,0
	1,9x10 <sup>7</sup>	3,25	3,5x10 <sup>7</sup>	1,5	1,9x10 <sup>7</sup>	3,5	3,6x10 <sup>7</sup>	0	2,9x10 <sup>7</sup>	2,0	0,64x10 <sup>7</sup>	2,0
	2,0x10 <sup>7</sup>	2,75	1,1x10 <sup>7</sup>	1,5	1,0x10 <sup>7</sup>	2,25			0,6x10 <sup>7</sup>	2,5	0,72x10 <sup>7</sup>	2,0
	2,2x10 <sup>7</sup>	2,25	1,35x10 <sup>7</sup>	1,75	2,75x10 <sup>7</sup>	2,5			2,8x10 <sup>7</sup>	2,5	0,91x10 <sup>7</sup>	2,0
	1,0x10 <sup>7</sup>	1,25	3,25x10 <sup>7</sup>	1,25	1,35x10 <sup>7</sup>	2,75			0,71x10 <sup>7</sup>	2,5	1,4x10 <sup>7</sup>	2,25
	1,5x10 <sup>7</sup>	1,0	2,85x10 <sup>7</sup>	1,25	1,8x10 <sup>7</sup>	2,25			0,75x10 <sup>7</sup>	2,5	1,1x10 <sup>7</sup>	2,25
<b>Mittel- wert</b>	1,61x10 <sup>7</sup>	<b>2,0</b>	1,9x10 <sup>7</sup>	<b>1,6</b>	1,45x10 <sup>7</sup>	<b>2,65</b>	3,0x10 <sup>7</sup>	<b>-0,08</b>	1,57x10 <sup>7</sup>	<b>2,3</b>	0,81x10 <sup>7</sup>	<b>2,15</b>
<b>STABW</b>		0,78		0,5		0,6		0,13		0,46		0,3

### 3.4.2 PAE bei Ceftazidim

Bei allen 6 Stämmen wurde der Postantibiotische Effekt gegenüber Ceftazidim getestet in sieben bis zehn Parallelansätzen.

Das Inokulum schwankte zwischen  $0,5 \times 10^7$  und  $5,0 \times 10^7$  KBE/ml. Die Expositionszeit betrug 2 Stunden mit nachfolgender Überprüfung des Keimwachstums über 10 Stunden.

40 µg/ml Ceftazidim mit 2h Wirkzeit auf die Bakterien erbrachten nur eine Reduzierung der Keimzahl um eine Zehnerpotenz ( $\lg_{10}$  KBE/ml) bei allen Teststämmen.

Die ermittelten Postantibiotischen Effekte zeigten Differenzen zwischen den einzelnen Stämme (siehe Tabelle 6). Beim ATCC 27853 ergab sich ein PAE mit 2,78 h. Bei den Stämmen 8536 und 623 lagen die ermittelten Werte für den PAE bei 2,3 und 2,4 Stunden. Bei Stamm 17 wurde ein negativer PAE beobachtet (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6** Bestimmung des PAE in Gegenwart von Ceftazidim (40 µg/ml) bei den Teststämmen

Stamm 3		Stamm 8536		Stamm 17		Stamm 32		Stamm 623		ATCC 27853		
Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	
5,0 x 10 <sup>7</sup>	1,0	0,71 x 10 <sup>7</sup>	2,0	1,0x10 <sup>7</sup>	0	1,0 x 10 <sup>7</sup>	1,0	1,35 x 10 <sup>7</sup>	4,0	0,70 x 10 <sup>7</sup>	5,5	
5,0 x 10 <sup>7</sup>	1,0	1,2 x 10 <sup>7</sup>	2,0	1,1 x 10 <sup>7</sup>	-1,0	0,83 x 10 <sup>7</sup>	1,5	0,6 x 10 <sup>7</sup>	4,0	0,79 x 10 <sup>7</sup>	3,25	
4,2 x 10 <sup>7</sup>	0,75	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,25	1,0 x 10 <sup>7</sup>	-1,75	1,5 x 10 <sup>7</sup>	0	0,55 x 10 <sup>7</sup>	3,0	0,65 x 10 <sup>7</sup>	6,0	
2,9 x 10 <sup>7</sup>	0	2,6 x 10 <sup>7</sup>	2,25	0,76 x 10 <sup>7</sup>	0	0,5 x 10 <sup>7</sup>	1,0	1,25 x 10 <sup>7</sup>	3,75	0,65 x 10 <sup>7</sup>	4,5	
2,3 x 10 <sup>7</sup>	0	2,25 x 10 <sup>7</sup>	3,0	1,1 x 10 <sup>7</sup>	0,25	1,6 x 10 <sup>7</sup>	0	0,77 x 10 <sup>7</sup>	2,5	0,72 x 10 <sup>7</sup>	0,25	
2,8 x 10 <sup>7</sup>	-0,75	2,5 x 10 <sup>7</sup>	2,0	0,60 x 10 <sup>7</sup>	0	1,78 x 10 <sup>7</sup>	0	0,81 x 10 <sup>7</sup>	1,75	0,5 x 10 <sup>7</sup>	0,25	
1,6 x 10 <sup>7</sup>	-1,25	3,6 x 10 <sup>7</sup>	3,5	1,25 x 10 <sup>7</sup>	0,25	1,6 x 10 <sup>7</sup>	0	1,6 x 10 <sup>7</sup>	1,0	2,3 x 10 <sup>7</sup>	2,5	
1,0 x 10 <sup>7</sup>	-0,25	1,9 x 10 <sup>7</sup>	3,0	1,14 x 10 <sup>7</sup>	-0,5			1,8 x 10 <sup>7</sup>	1,25	2,3 x 10 <sup>7</sup>	2,25	
1,0 x 10 <sup>7</sup>	0,75	2,7 x 10 <sup>7</sup>	2,5	1,45 x 10 <sup>7</sup>	0			2,0 x 10 <sup>7</sup>	1,25	3,2 x 10 <sup>7</sup>	4,75	
								0,7 x 10 <sup>7</sup>	1,5	2,0 x 10 <sup>7</sup>	1,75	
										1,7 x 10 <sup>7</sup>	1,75	
										1,0 x 10 <sup>7</sup>	1,0	
										2,2 x 10 <sup>7</sup>	2,5	
2,86x10 <sup>7</sup>	<b>0,14</b>	2,09x10 <sup>7</sup>	<b>2,3</b>	1,04x10 <sup>7</sup>	<b>-0,3</b>	1,25x10 <sup>7</sup>	<b>0,5</b>	1,1x10 <sup>7</sup>	<b>2,4</b>	1,4x10 <sup>7</sup>	<b>2,78</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,8		0,68		0,67		0,64		1,2		1,9	<b>STABW</b>

### 3.4.3 PAE bei Ceftazidim plus Amikacin

Die Kombination eines Beta-Laktamantibiotikums mit einem Aminoglykosid zeigt synergistische Wirkung (Dalhoff 1990).

Der PAE wurde bei den Stämmen 3, 623, 32 und dem ATCC 27853 getestet. Es wurde nur mit diesen Stämmen weiter gearbeitet, um Extreme darzustellen, das heißt extrem sensibel und resistente Stämme. Die Testreihen wurden jeweils 4mal wiederholt.

Die Kombination beider Antibiotika führte bei allen getesteten Stämmen zu einer Verlängerung des Postantibiotischen Effektes gegenüber der Einzelexposition der Antibiotika. Der ATCC- und der sensible Stamm 623 zeigten dabei fast eine Verdopplung des PAE bei Amikacin (siehe Tabelle 7). Der resistente Stamm 32 besitzt bei Einzelexposition von Amikacin oder Ceftazidim nur einen kurzandauernden PAE. Die Kombination beider Substanzen zeigt in allen Fällen einen positive Postantibiotischen Effekt der getesteten antimikrobiellen Substanzen.

Tabelle 7 PAE der getesteten Stämme für Amikacin, Ceftazidim und die Kombination der beiden Antibiotika (Angaben in Stunden)

	<b>Stamm 32</b>	<b>Stamm 623</b>	<b>ATCC 27853</b>	<b>Stamm 3</b>
<b>Antibiotikum</b>	<b>PAE in Stunden</b>			
<b>Amikacin</b>	-0,8	2,3	2,15	2,0
<b>Ceftazidim</b>	0,5	2,4	2,78	0,14
<b>Kombination</b>	2,75	5,37	5,12	2,43

**Tabelle 8** Postantibiotischer Effekt bei der Kombination von Amikacin und Ceftazidim

Stamm 32		Stamm 623		ATCC 27853		Stamm 3		
Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	PAE in Stunden	
2,25 x 10 <sup>7</sup>	2,75	1,0 x 10 <sup>7</sup>	6,75	0,52 x 10 <sup>7</sup>	6,5	1,0 x 10 <sup>7</sup>	2,75	
1,38 x 10 <sup>7</sup>	3,25	1,1 x 10 <sup>7</sup>	4,75	0,40 x 10 <sup>7</sup>	6,0	1,22 x 10 <sup>7</sup>	2,25	
1,4 x 10 <sup>7</sup>	3,5	0,5 x 10 <sup>7</sup>	4,0	7,25 x 10 <sup>7</sup>	3,25	1,1 x 10 <sup>7</sup>	2,0	
0,82 x 10 <sup>7</sup>	1,5	1,1 x 10 <sup>7</sup>	6,0	1,0 x 10 <sup>7</sup>	4,75	1,1 x 10 <sup>7</sup>	2,75	
1,46x10 <sup>7</sup>	<b>2,75</b>	0,9x10 <sup>7</sup>	<b>5,37</b>	2,29x10 <sup>7</sup>	<b>5,12</b>	1,1x10 <sup>7</sup>	<b>2,43</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,88		1,2		1,4		0,37	<b>STABW</b>

### 3.5 Postantibiotischer Effekt mit dreimaliger Exposition von Amikacin, Ceftazidim und der Kombination beider Antibiotika

#### 3.5.1 PAE bei Amikacin

Für die Untersuchung des Postantibiotischen Effektes bei mehrmaliger Zugabe der antimikrobiellen Substanzen wurden die Stämme 3, 32 und der ATCC 27853 genommen.

Die Experimente wurden in drei bis vier Parallelansätzen durchgeführt.

Das Inokulum vor der 1. Exposition bei allen drei Stämmen lag zwischen  $0,8 \times 10^7$  bis  $9,5 \times 10^7$  KBE/ml. Die Verringerung der Keimzahl während der ersten Exposition bei Stamm 3 und dem ATCC lag zwischen 2-4 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml), bei Stamm 32 war keine bis eine ganz geringe Verringerung der Keimeinsaat zu verzeichnen.

Die 2. Exposition mit Amikacin erfolgte 8-10 Stunden nach der ersten. Die Bakterien waren zu diese Zeitpunkt fast auf das Ausgangsinokulum angewachsen. Die Wirkung von Amikacin zeigte nach der 2. Exposition bei Stamm 3 eine Verringerung der Bakterienzahl um 1-2 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml). Nach der 3. Exposition, die 8-12 Stunden später erfolgte, war das Inokulum nach 2 Stunden Einwirkung von Amikacin gleichgeblieben oder verringerte sich um maximal eine Zehnerpotenz. Der PAE bei Stamm 3 zeigte kaum Veränderungen über die drei Expositionszeiten, er bleibt fast konstant (0,71-0,97 Stunden).

Beim ATCC 27853 war die Verringerung des Inokulums bei der 1. und 2. Exposition gleich, um 3-4 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml). Nach der 3. Exposition zeigte sich eine verringerte bis keine Wirkung auf den Stamm. Der Postantibiotische Effekt zeigte nach der 2. Exposition eine Verlängerung, nach der 3. Exposition eine Verkürzung gegenüber der 2. Exposition.

Der gegenüber Amikacin resistente Stamm 32 ließ über die drei Inkubationszeiten keine Verringerung der Keimzahl erkennen. Der PAE war nach der 1. und 2. Exposition kurz und gleichbleibend, aber nach der 3. Exposition zeigte sich eine deutliche Verlängerung von 0,87 auf 2,33 Stunden.

Tabelle 9 PAE von Pseudomonas aeruginosa mit Amikacin (20µg/ml) nach dreimaliger Exposition

Stamm	1.Inkubation			2.Inkubation			3.Inkubation		
	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden
<b>3</b>	1,7 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0	7,5 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	1,5	2,8 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>	2,25
	1,1 x 10 <sup>7</sup>	7,5 x 10 <sup>5</sup>	3,75	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	3,5	5,8 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	2,75
	1,7 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup>	2,25	5,5 x 10 <sup>6</sup>	8,25 x 10 <sup>4</sup>	4,25	6,5 x 10 <sup>6</sup>	5,2 x 10 <sup>6</sup>	1,5
	1,1 x 10 <sup>7</sup>	7,5 x 10 <sup>5</sup>	2,25	8,5 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>	4,0	6,1 x 10 <sup>7</sup>	6,0 x 10 <sup>7</sup>	4,0
<b>Mittelwert</b>			<b>2,81</b>			<b>3,06</b>			<b>2,91</b>
<b>Standardabw</b>			0,71			0,97			0,97
<b>32</b>	8,65 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup>	-1,0	1,35 x 10 <sup>7</sup>	1,15 x 10 <sup>7</sup>	0	1,25 x 10 <sup>8</sup>	2,0 x 10 <sup>8</sup>	2,0
	9,5 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>	1,25	9,5 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	2,0	1,55 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x 10 <sup>6</sup>	2,5
	8,5 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>	0	1,35 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	1,0	1,35 x 10 <sup>7</sup>	1,15 x 10 <sup>7</sup>	2,5
<b>Mittelwert</b>			<b>0,75</b>			<b>0,87</b>			<b>2,33</b>
<b>Standardabw</b>			0,66			0,77			0,28
<b>ATCC</b>	4,65 x 10 <sup>7</sup>	6,75 x 10 <sup>4</sup>	1,75	7,0 x 10 <sup>7</sup>	6,0 x 10 <sup>3</sup>	3,0	1,7 x 10 <sup>7</sup>	7,25 x 10 <sup>5</sup>	3,5
<b>27853</b>	3,35 x 10 <sup>7</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	3,25	4,75 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>1</sup>	8,0	5,0 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	4,0
	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	1,75	2,9 x 10 <sup>7</sup>	5,0 x 10 <sup>3</sup>	4,25	1,25 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	3,0
<b>Mittelwert</b>			<b>2,25</b>			<b>5,08</b>			<b>3,5</b>
<b>Standardabw</b>			0,86			2,6			0,5

### 3.5.2 PAE bei Ceftazidim

Die Testung von Ceftazidim in einmaliger Exposition (ersten Testungen) ergaben für Stamm 3 und 32 einen kurzdauernden Postantibiotischen Effekt bei einem Inokulum von  $1,0-2,8 \times 10^7$  KBE/ml.

Bei Beginn (1.Exposition) des Testablaufes zur mehrmaligen Zugabe von Ceftazidim zeigte der Stamm 32 mit einem Inokulum von  $7,0 \times 10^6$  KBE/ml einen PAE von 2,8 h.

Die ersten Versuche mit dem ATCC-Stamm und Ceftazidim ließen einen PAE von 2,8 Stunden erkennen, bei der dreimaligen Exposition war zu Beginn ein PAE von 1,5 Stunden zu verzeichnen bei fast gleichem Inokulum.

Das Antibiotikum wurde zur 2. Exposition 7-8 h nach der 1. Exposition auf die Bouillonkultur gegeben, und zur 3. Exposition 8-9 h nach der 2. Exposition.

Ceftazidim brachte während jeder Inkubation bei allen 3 Isolaten eine Senkung des Inokulums um 2 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml). Die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Ceftazidim veränderte sich über die 3 Expositionszeiten in Folge kaum.

Der Postantibiotische Effekt von Stamm 3 verlängerte sich von 0,38 h auf 1,2 h.

Beim Stamm 32 zeigt sich eine geringer Abfall des PAE von 2,8 h auf 2,0 h.

Der ATCC 27853-Stamm ließ eine Verlängerung des PAE von 1,5 h über 2,2 h bis zu 2,5 h in der 3. Exposition erkennen.

**Tabelle 10** PAE von Ceftazidim 40 µg/ml in dreimaliger Exposition bei den Teststämmen

Stamm	1.Inkubation			2.Inkubation			3.Inkubation		
	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden
<b>3</b>	5,0 x 10 <sup>7</sup>	5,25 x 10 <sup>5</sup>	0,5	8,5 x 10 <sup>6</sup>	1,22 x 10 <sup>6</sup>	1,0	2,05 x 10 <sup>7</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0
	8,0 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	1,0	8,0 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	1,75	2,1 x 10 <sup>7</sup>	5,6 x 10 <sup>6</sup>	1,25
	6,0 x 10 <sup>7</sup>	5,75 x 10 <sup>5</sup>	0	9,0 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>	1,5	2,0 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	1,5
	7,0 x 10 <sup>7</sup>	3,15 x 10 <sup>5</sup>	0	1,0 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0	1,4 x 10 <sup>7</sup>	5,8 x 10 <sup>6</sup>	1,0
	<b>Mittelwert</b>	6,5 x 10 <sup>7</sup>		<b>0,38</b>	8,9x10 <sup>6</sup>		<b>1,31</b>	1,9x10 <sup>7</sup>	
<b>Standardab</b>			0,48			0,37			0,23
<b>32</b>	8,5 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	3,0	6,5 x 10 <sup>6</sup>	6,5 x 10 <sup>4</sup>	0,75	1,42 x 10 <sup>6</sup>	1,5 x 10 <sup>4</sup>	1,75
	5,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,5	9,5 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0	1,72 x 10 <sup>6</sup>	1,75 x 10 <sup>4</sup>	2,5
	8,25 x 10 <sup>6</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>	3,0	3,0 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	0,75	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,25 x 10 <sup>5</sup>	1,75
	6,6 x 10 <sup>6</sup>	8,5 x 10 <sup>4</sup>	2,75	8,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,0	2,75 x 10 <sup>6</sup>	1,02 x 10 <sup>5</sup>	2,25
	<b>Mittelwert</b>	7,0 x 10 <sup>6</sup>		<b>2,81</b>	6,75x10 <sup>6</sup>		<b>1,12</b>	1,9x10 <sup>6</sup>	
<b>Standardab</b>			0,23			0,59			0,37
<b>ATCC 27853</b>	1,55 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>	2,0	2,5 x 10 <sup>6</sup>	4,15 x 10 <sup>4</sup>	2,5	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	3,25
	1,77 x 10 <sup>7</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	1,5	1,5 x 10 <sup>6</sup>	4,25 x 10 <sup>4</sup>	2,5	2,4 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	3,0
	1,85 x 10 <sup>7</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	1,25	1,3 x 10 <sup>6</sup>	2,25 x 10 <sup>5</sup>	2,5	3,0 x 10 <sup>6</sup>	2,9 x 10 <sup>5</sup>	2,5
	2,05 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>	1,25	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	1,25	7,0 x 10 <sup>6</sup>	2,75 x 10 <sup>5</sup>	1,25
	<b>Mittelwert</b>	1,8 x 10 <sup>7</sup>		<b>1,5</b>			<b>2,18</b>		
<b>Standardab</b>			0,35			0,63			0,88

### 3.5.3 PAE bei Ceftazidim plus Amikacin

Bei der Untersuchung des PAE über eine dreimalige Exposition der Bakterienkultur ergaben sich differente Werte unter den 3 getesteten Stämmen.

Das Ausgangsinokulum für alle drei Stämme lag zwischen  $1,4$  und  $6,5 \times 10^7$  KBE/ml. Jeder Stamm wurde dreimal getestet. Die Keimzahl nach der 1. Exposition verringerte sich um 2-5 Zehnerpotenzen ( $\lg_{10}$  KBE/ml). Nach der 2. Exposition der Bakterienkultur mit der Antibiotikakombination war die Keimzahl ebenfalls um 2-4 Zehnerpotenzen abgesunken.

Der PAE verkürzte sich bei allen drei Stämmen.

Stamm 3 zeigte nach der 3. Inkubationsphase eine deutliche Verlängerung des PAE um 2,3 h.

Der Stamm 32 ließ ebenfalls nach der 3. Exposition eine Verlängerung des PAE erkennen.

Tabelle 11 Testung Ceftazidim 40 µg/ml plus Amikacin 20 µg/ml in dreimaliger Exposition

Stamm	1.Inkubation			2.Inkubation			3.Inkubation		
	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden	Inokulum KBE/ml	Keimzahl vor AB- entfernung	PAE in Stunden
<b>3</b>	3,07 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	2,25	2,5 x 10 <sup>7</sup>	6,25 x 10 <sup>5</sup>	1,25	8,0 x 10 <sup>6</sup>	2,65 x 10 <sup>3</sup>	3,25
	3,45 x 10 <sup>7</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>	1,5	5,8 x 10 <sup>7</sup>	8,5 x 10 <sup>5</sup>	0,75	1,0 x 10 <sup>7</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	3,0
	3,7 x 10 <sup>7</sup>	1,27 x 10 <sup>4</sup>	3,25	2,0 x 10 <sup>7</sup>	2,75 x 10 <sup>5</sup>	0,75	4,0 x 10 <sup>7</sup>	3,8 x 10 <sup>3</sup>	3,5
<b>Mittelwert</b>			<b>2,33</b>			<b>0,91</b>			<b>3,25</b>
<b>Standardab</b>			<b>0,878</b>			<b>0,28</b>			<b>0,25</b>
<b>32</b>	1,75 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x 10 <sup>5</sup>	2,75	5,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	0	2,45 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x 10 <sup>5</sup>	1,0
	1,62 x 10 <sup>7</sup>	4,75 x 10 <sup>5</sup>	3,0	4,0 x 10 <sup>6</sup>	7,0 x 10 <sup>2</sup>	0	5,5 x 10 <sup>6</sup>	1,75 x 10 <sup>4</sup>	2,0
	1,37 x 10 <sup>7</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>	3,0	2,2 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>2</sup>	0,25	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,25 x 10 <sup>4</sup>	0,75
<b>Mittelwert</b>			<b>2,91</b>			<b>0,08</b>			<b>1,25</b>
<b>Standardab</b>			<b>0,14</b>			<b>0,14</b>			<b>0,66</b>
<b>ATCC 27853</b>	6,0 x 10 <sup>7</sup>	1,35 x 10 <sup>4</sup>	3,75	4,1 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,5	1,6 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	3,0
	2,0 x 10 <sup>7</sup>	8,0 x 10 <sup>2</sup>	3,75	8,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	4,25	8,5 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,25
	6,0 x 10 <sup>7</sup>	1,47 x 10 <sup>4</sup>	3,75	3,6 x 10 <sup>7</sup>	1,75 x 10 <sup>3</sup>	1,5	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	3,5
<b>Mittelwert</b>			<b>3,75</b>			<b>2,6</b>			<b>2,58</b>
<b>Standardab</b>			<b>0</b>			<b>1,13</b>			<b>1,18</b>

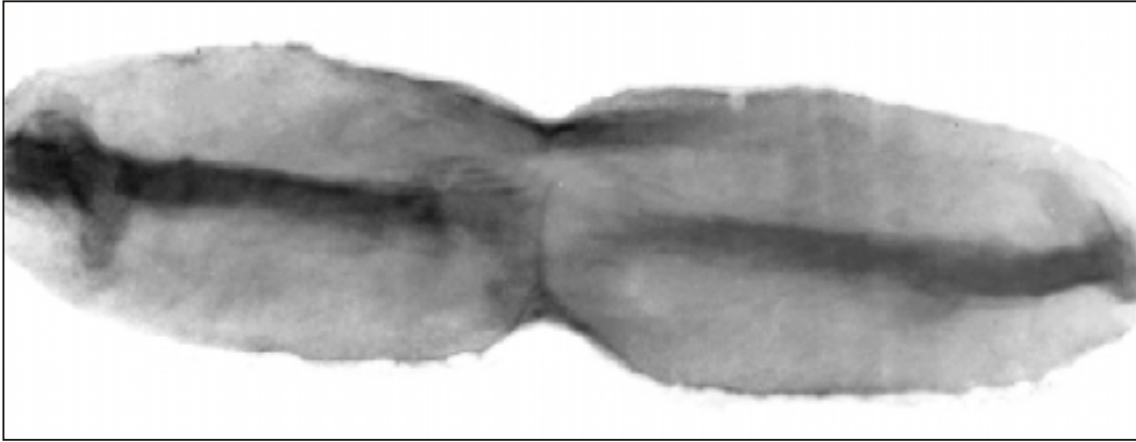
### 3.5.4 Fotografische Darstellung der Bakterienzellen

Bei den Beta-Lactamantibiotika führt der Eingriff in die Peptidoglykansynthese zu Sphäroplasten- oder Filamentbildung (Munckhof et al. 1997). So führt die Bindung an das Penicillinbindende Protein 3 (PBP) zur Filamentbildung während die Bindung an PBP 2 Sphäroblastenbildung zur Folge hat.

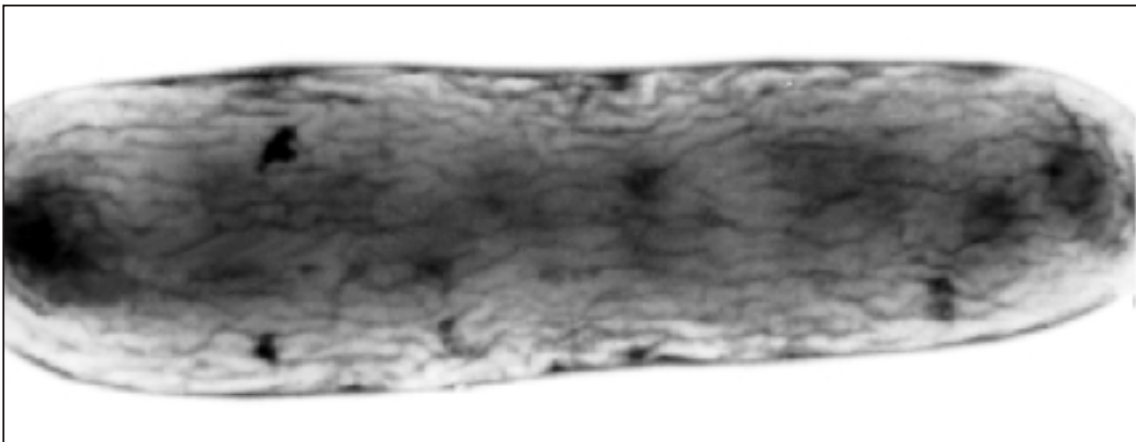
Erkennbar sind bei den mit Amikacin und/oder Ceftazidim inkubierten Bakterienzellen von *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) eine nicht scharf abgrenzbare periphere Zellwand sowie Zerstörungen in der Zellwand. Außerdem ist die Filamentbildung unter Einwirkung von Ceftazidim sehr gut nachvollziehbar gewesen.

Abb. 15

Negativkontrolle mit Elektronenmikroskop 24.000fach vergrößert,  
Bakterienzelle in Teilungsphase



Negativkontrolle 32.000fach vergrößert, Bakterienzelle  
mit scharf abgrenzbarer Zellwand



Negativkontrolle bei 100facher Vergrößerung

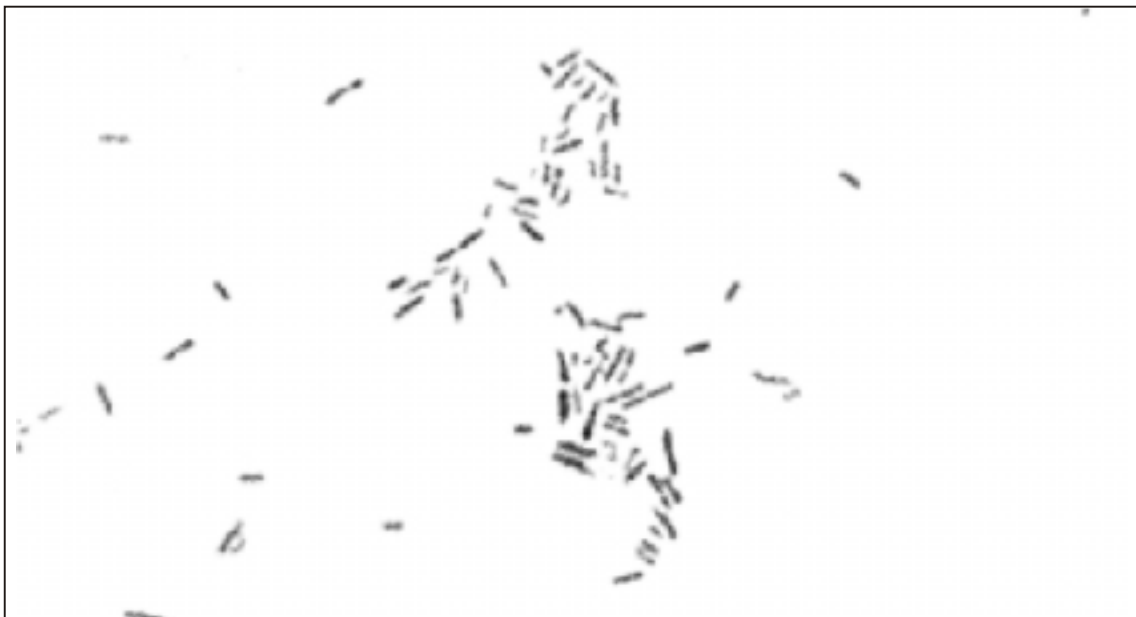
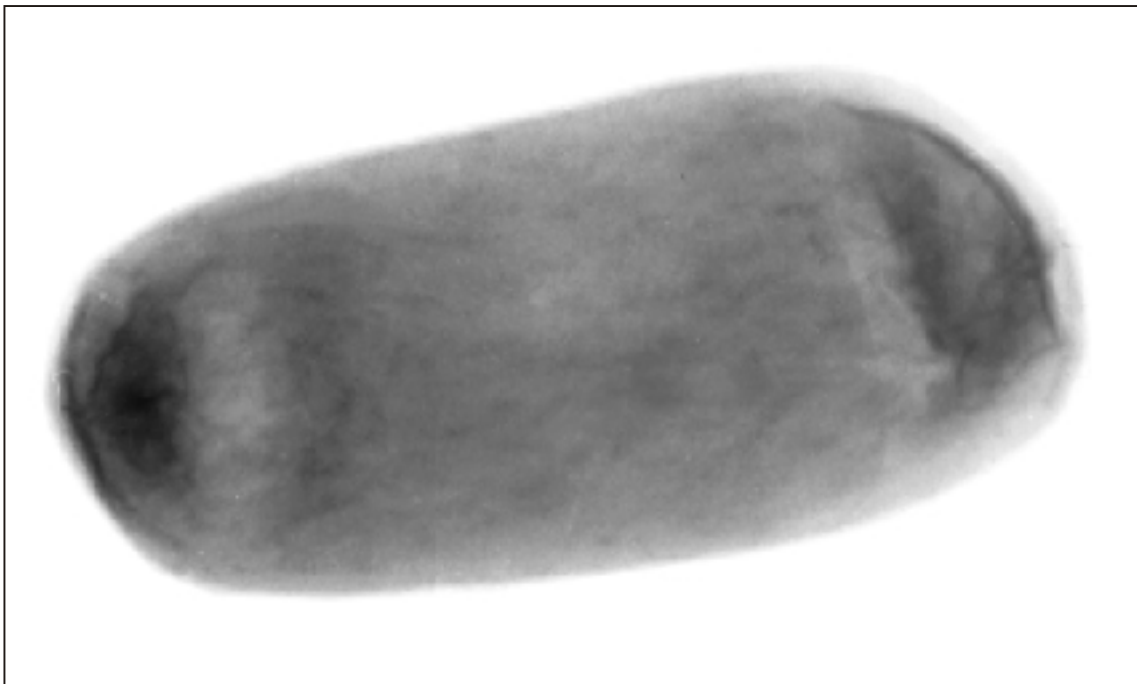


Abb. 16

Bakterienzelle mit Amikacin inkubiert, 32.000fach vergrößert,  
unscharfe Konturen im Zytoplasma



Bakterienzelle mit Amikacin inkubiert, 100fach vergrößert

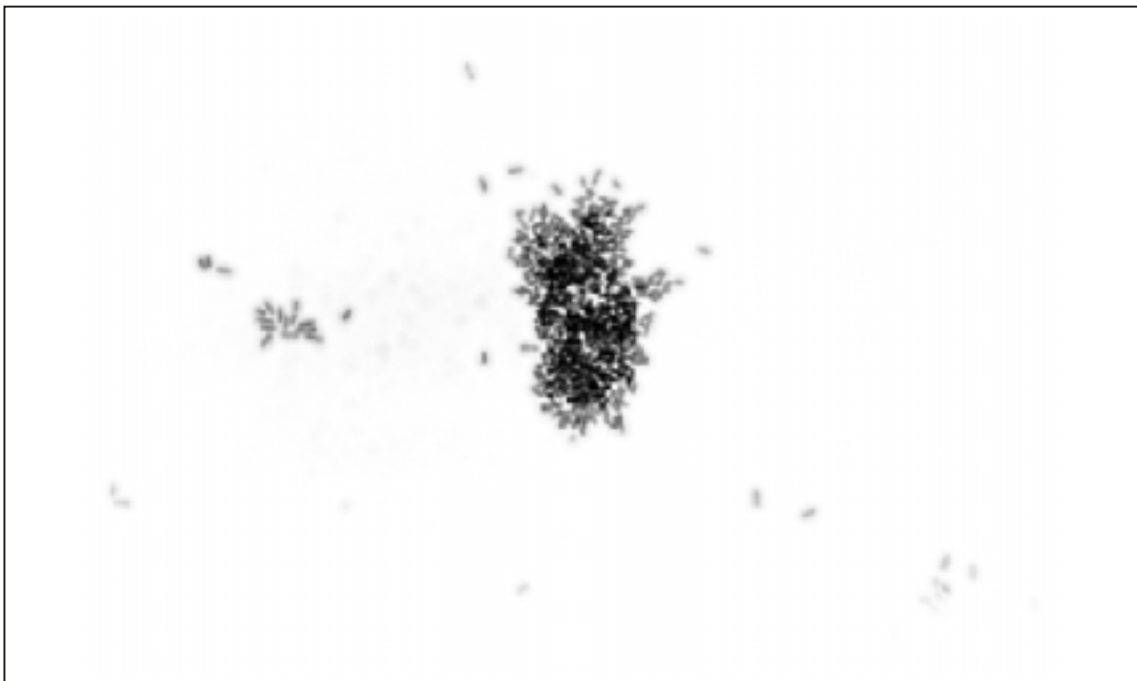


Abb. 17

Bakterienzelle mit Ceftazidim inkubiert, 32.000fach vergrößert  
Darstellung einer polaren Bewegungsgeißel



Abb. 18

Bakterienzellen mit Ceftazidim inkubiert, 8.000fach vergrößert, Filamentstruktur



Bakterienzellen mit Ceftazidim inkubiert, 100fach vergrößert, Filamentstruktur

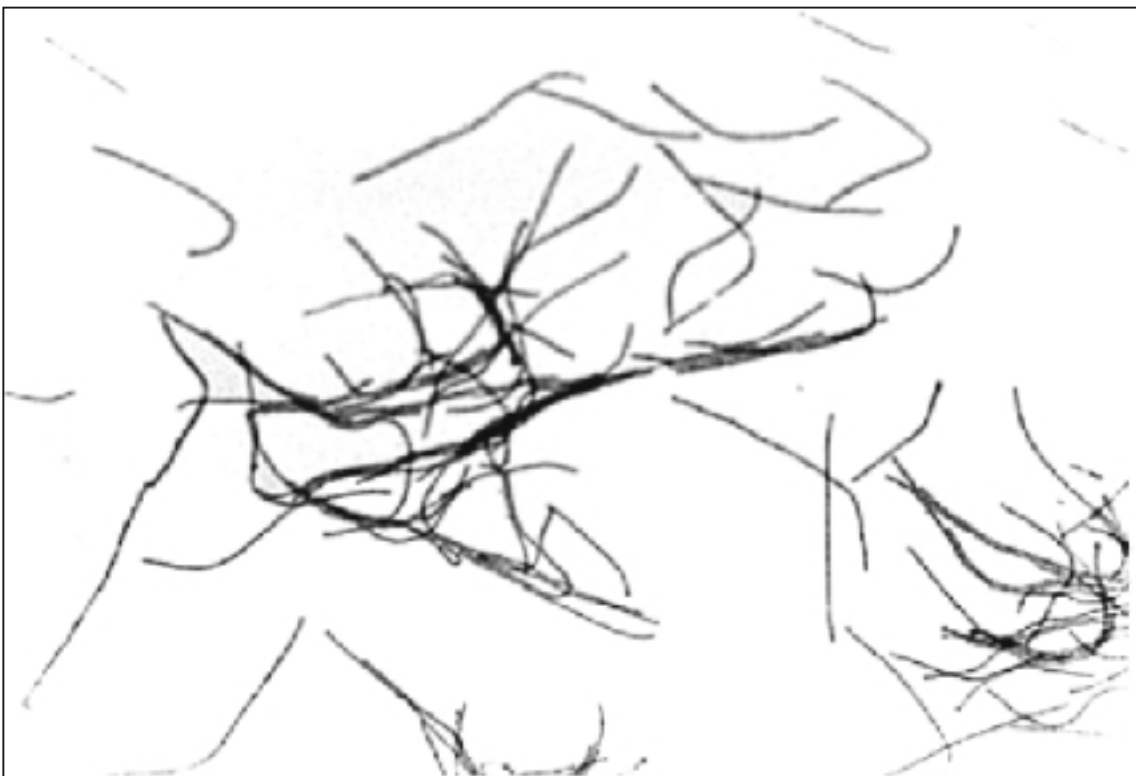
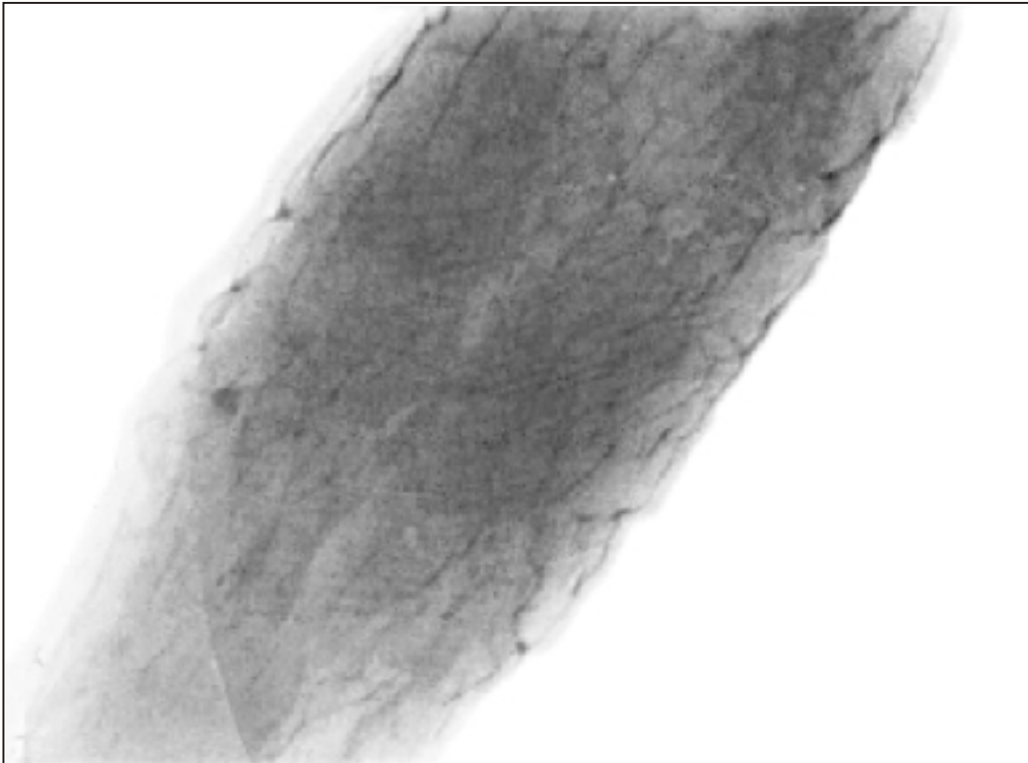


Abb. 19

Bakterienzelle inkubiert mit Amikacin + Ceftazidim,  
100.000fach vergrößert



Bakterienzellen inkubiert mit Amikacin + Ceftazidim,  
100fach vergrößert

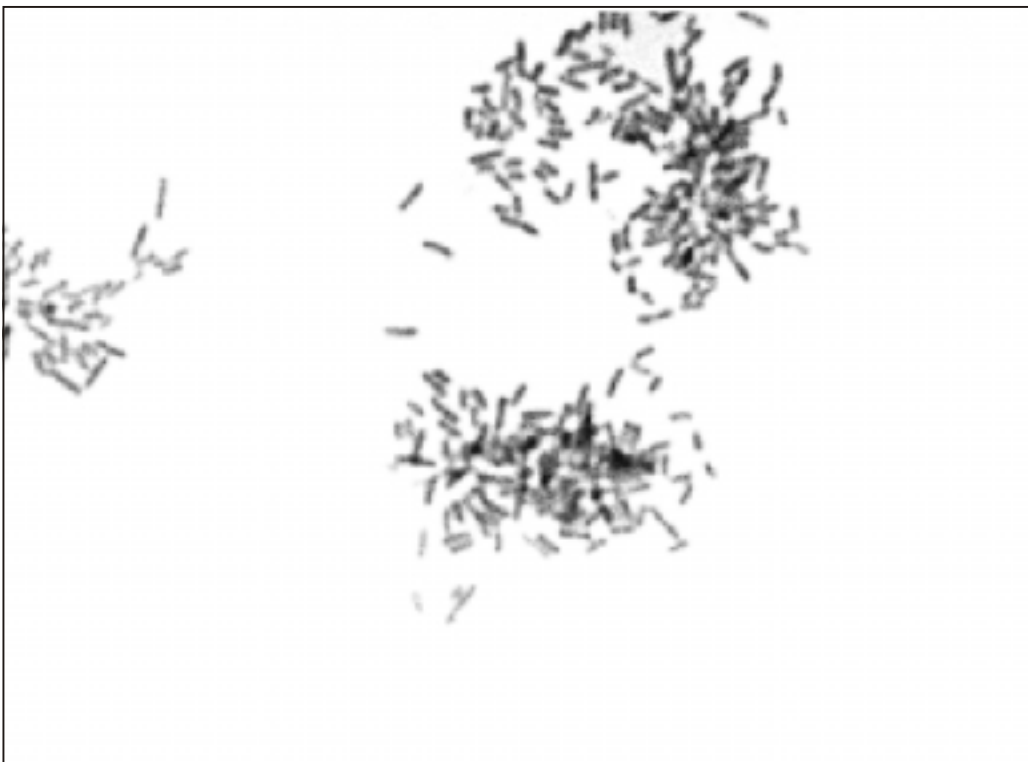


Abb. 20

Bakterienzelle inkubiert mit Amikacin + Ceftazidim,  
44.000fach vergrößert.  
Darstellung von polaren Geißeln, unscharfe Zellwand  
erkennbar

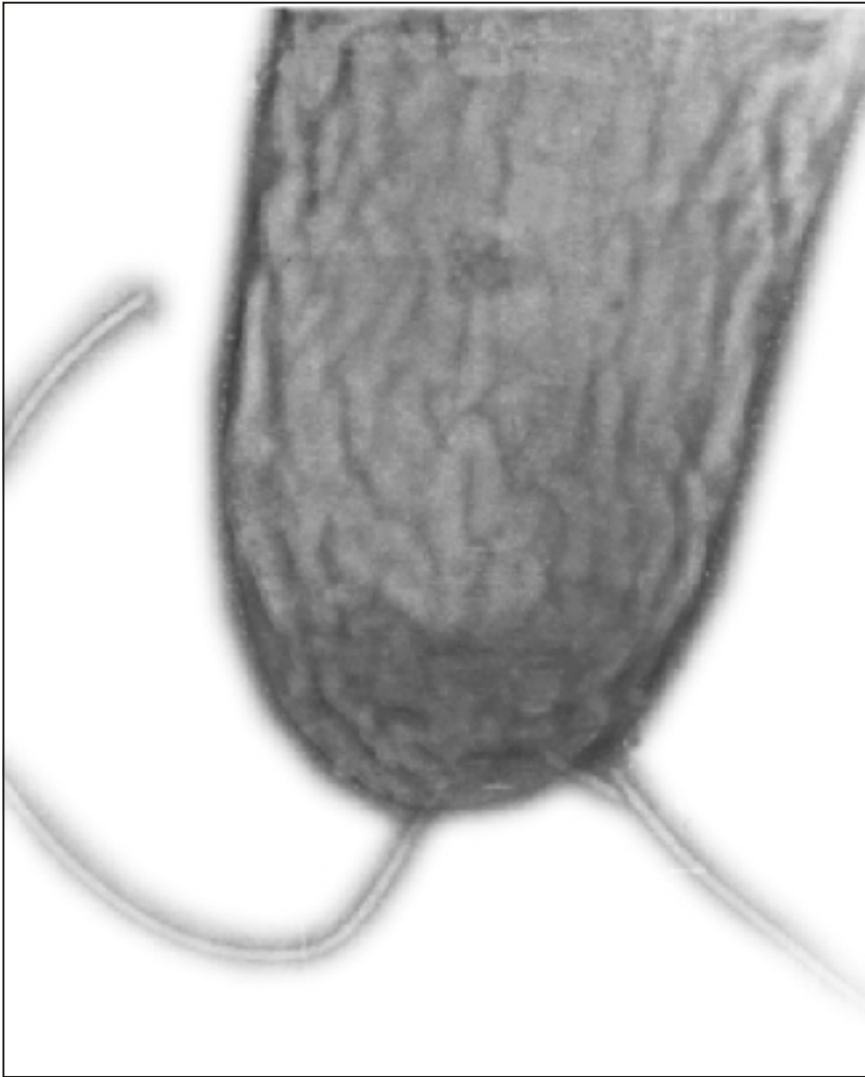


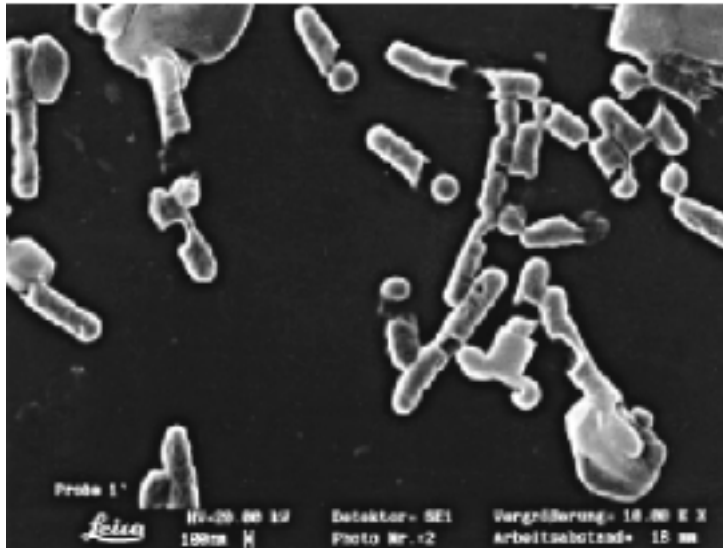
Abb. 21

Bakterienzellen mit Amikacin inkubiert, Lyse der Zellen erkennbar, Rasterelektronenmikroskopie



Abb. 22

Bakterienzellen mit Amikacin inkubiert,  
zerstörte Zellwand erkennbar, Lyse der Zellen,  
Rasterelektronenmikroskopie



## 4 Diskussion

---

### 4.1 Methoden der PAE-Bestimmung

Verschiedene Methoden der PAE-Bestimmung variieren in ihren Ergebnissen (Ada 1989). So beträgt der PAE bei *Pseudomonas aeruginosa* mit Imipenem nach der Zell-Zähl-Methode 1,5-2,5 Stunden und nach der Bioluminescence-Methode (ATP-Messung) > 4 Stunden (Gupta et al. 1988). Die ATP-Messung bringt längere PAE hervor als die Zell-Zähl-Methode. Sie beinhaltet die Messung von Zellmasse, lebender und toter. Genauer formuliert bestimmt man die metabolische Aktivität der lebenden Zellen.

Nach Odenholt 1989 ist die direkte Messung der Zahl der überlebenden und erneut wachsenden Bakterien in der Kultur nach Antibiotikaentfernung die der Realität am nächsten kommende Methode zur Ermittlung des PAE.

Wir haben uns deshalb für diese Methode entschieden. Der experimentelle Ablauf gestaltete sich nach Protokollen von B. J. Mc. Grath (1993), W. A. Graig (1991) und C. I. Bustamante (1984).

Auch die Art des eingesetzten Medium spielt eine Rolle. Gudmundsson, Vogelmann et al. (1994) untersuchten den pH-Einfluß auf die Dauer des PAE. Sie erkannten, daß der pH einen signifikanten Einfluß auf den PAE ausübt. Optimal stellt sich ein pH-Wert von 7,4 dar, was dem *pH-Wert* im Serum entspricht (Ronald et al. 1997). Dieser kann aber in vivo variieren, z.B. in Abszessen. Ein saurer pH-Wert reduziert die Dauer des PAE bei Aminoglykosiden (Gerber 1993, Craig et al. 1991).

### 4.2 Inokulum-Effekt, Wirkung auf die Bakterizidie

Odenholt et al. (1989) demonstrierten einen PAE von Imipenem bei *Pseudomonas aeruginosa* von 1-2 Stunden mit der Zell-Zähl-Methode bei einem eingesetzten Inokulum von  $10^6$  KBE/ml. Bei einem Inokulum von  $10^8$  KBE/ml war kein PAE zu beobachten. Auch Gerber (1993) bestätigte den Einfluß der Größe des Inokulums auf den PAE.

Eine Ceftazidim-Konzentration von 2,5 µg/ml reduziert die Zahl der lebensfähigen Organismen bei einem Ausgangsinokulum von  $10^5$ - $10^6$  KBE/ml um 1,5 Zehnerpotenzen erst nach 4,5 Stunden. Mit einer höheren Ceftazidim-Konzentration von 10 µg/ml wird die Zahl der lebensfähigen Bakterien innerhalb von 5 Stunden um mehr als 99 % reduziert (Harper 1991). Um eine hohe bakterizide Wirkung auf die Bakterien zu erzielen wurde bei den Testabläufen die Serumspiegelkonzentration (Ceftazidim 40 µg/ml, Amikacin 20 µg/ml) gewählt mit einer Expositionszeit von 2 Stunden.

Die bakterizide Wirkung läßt sich auch morphologisch darstellen.

Bei den Beta-Laktamantibiotika führt der Eingriff in die Peptidoglykansynthese zur Sphäroblasten- oder Filamentbildung. Dies kann mit der Bindung an unterschiedliche Enzyme korreliert werden. So führt die Bindung an das PBP 3 zur Filamentbildung, während die Bindung an PBP 2 zu Sphäroblasten führt (Laverdiere et al. 1994).

Hanberger et al. (1991) zeigten eine Konzentrationsabhängige Morphe von *Escherichia coli*, daß heißt bei Einsatz von Ceftazidim in Konzentration der MHK entsprechend ist eine Filamentbildung und in Serumspiegelgrößen eine Sphäroblastenbildung erkennbar. Gottfredsson et al. (1998) zeigten in Studien, daß 90 min nach Entfernung von Beta-Lactamantibiotika aus einer Bakterienkultur die Bakterienzellen ihre normale Form wieder erlangten.

Bei unseren eigenen Untersuchungen ist bei Einsatz von 40 µg/ml Ceftazidim auf alle *Pseudomonas*-Stämme eine Filamentbildung erkennbar.

Amikacin-Wirkungen lassen sich an der Lyse der Zellen erkennen.

Ein pharmakodynamischer Parameter um die antibakterielle Aktivität zu charakterisieren *in vitro* sind die *Zeit-Abtötungskurven*. Sie demonstrieren den zeitlichen Ablauf der bakteriziden Aktivität. Dabei korreliert eine excessiv rasche Abtötung mit einer hohen Antibiotikakonzentration.

Der *Serumbakterizidie-Test* dient zur Aktivitätsmessung von Antibiotika während der Therapie. Die Serumbakterizidie wird beeinflusst durch die Serumkonzentration der Antibiotika und die Empfindlichkeit des Erregers.

Wallrauch-Schwarz, Milatovic et al. (1993) zeigten in Studien, daß schon in der 1-g-Dosierung von Ceftazidim hohe Serumbakterizidie-Titer gegenüber Enterobakterien erreicht werden. Es ist somit eine gute therapeutische Wirksamkeit schon mit der 3x1-g-Dosierung erzielbar. Braveny et al. (1986) zeigten im Serumbakterizidie-Test, daß die abtötende Wirkung der Kombination Ceftazidim/Tobramycin stärker war als die der jeweiligen Einzelsubstanzen .

Die minimalen bakteriziden Konzentrationen liegen bei Antibiotika mit bakteriziden Wirkungstyp im allgemeinen nur um das Zweifache über der minimalen Hemmkonzentration, in seltenen Fällen kann die MBK um das 32fache und darüber höher sein als die MHK. MHK und MBK, als die beiden wichtigsten *in vitro* bestimmbar Parameter einer antibakteriellen Substanz, sind sie zwar pharmakodynamisch ausgerichtet, ihre Aussagekraft ist allerdings begrenzt, da sie aufgrund der *in vitro*-Bedingungen nie die im Organismus tatsächlich ablaufenden Vorgänge widerspiegeln.

Die MBK-Werte erlauben keine Aussage über die Abtötungskinetik von Bakterien. Unsere ermittelten MBK-Werte für Amikacin entsprechen den Literaturangaben (Braveny et al. 1986, Craig et al. 1991). Für die empfindlichen Stämme gegenüber Amikacin liegen sie zwischen dem 10-20fachen der MHK. Der resistente Stamm 32 hatte nur einen 2,5fachen Wert der MHK von Amikacin.

Stamm 623 als sensibel eingestufte Teststamm zeigt eine höhere MBK als Stamm 17 und 8536. Die einzelnen Klinikisolate reagieren also unterschiedlich. Eventuell könnte die Rauform des Stammes 623 eine hinweisende Erklärung sein.

Alle Stämme wurden hinsichtlich der Bakterizidie getestet. Der Einsatz der MHK brachte bei allen Stämmen keine wesentliche Reduzierung des eingesetzten Inokulums. Nur die Antibiotikakonzentrationen, die den Serumspiegeln entsprechen zeigten eine Reduzierung der Bakterienzahl, wobei hier die Kombination von Amikacin plus Ceftazidim die deutlichsten Ergebnisse brachte.

Der *Inokulum-Effekt* läßt sich so erklären, daß mit zunehmender Bakterienzellzahl die bakterizide Wirkung des Antibiotikums nachläßt. Dieser Inokulum-Effekt ist ein

Phänomen, das auch beschrieben wird als signifikantes Ansteigen der MHK von Beta-Laktamantibiotika, wenn die Zahl der Bakterien ansteigt und somit die Konzentration des Antibiotikums pro Bakterienzelle sinkt.

Der Inokulum-Effekt ließ sich nicht in allen Testreihen nachvollziehen.

### 4.3 Aminoglykoside und der PAE

Aminoglykoside sind unverändert hochwirksame und insbesondere auch kostengünstige Antibiotika für die Therapie schwerer Infektionen durch gramnegative Erreger. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, daß die tägliche Einmalgabe der gesamten Aminoglykosiddosis gleich günstige klinische Resultate bei besserer Verträglichkeit ergibt (Sturm 1989, Raz et al. 1995). Die *Einmalgabe* versus der *Dreimalgabe* von *Aminoglykosiden* ist von zahlreichen Autoren in experimentellen Studien untersucht worden (Gerber et al. 1989, Spivey 1992, Ronald et al. 1997). Der PAE bei Aminoglykosiden liefert einen mikrobiologischen Hinweis für die Möglichkeit der Einmaldosierung. Auch in Tiermodellen konnte gezeigt werden, daß die Nephrotoxizität reduziert wird bei der Einmalgabe (Hostacka 1996). Die Beziehung zwischen Dosis und Toxizität verläuft nicht linear, sondern ein Sättigungsmechanismus tritt ein.

Für Amikacin ließen sich bei den empfindlichen Stämmen (8536, 3, 17, 623, ATCC 27853) PAE-Werte von 1,6-2,6 Stunden ermitteln.

Der ATCC Stamm 27853 hatte einen PAE von 2,15 Stunden, was den Literaturangaben entspricht (Gerber 1993, Armstrong et al. 1981).

Stamm 3 und 17 mit ähnlichem Resistenzmuster in der MHK-Bestimmung zeigen eine Differenz im PAE von 0,6 Stunden.

### 4.4 Beta-Lactamantibiotika und der PAE

Der resistente Stamm 32 zeigte im Mittel keinen bis negativen PAE.

Negativer PAE nach Gerber und Craig (1982): „Es kommt in der vorexponierten Kultur (mit Antibiotikum) im Vergleich zur Negativkontrolle zu einem paradox schnelleren Wachstum, so daß der  $\lg_{10}$  Wert in der Testkultur früher erreicht wird als in der Negativkontrolle. Die paradox schnellere Wachstumsphase von gramnegativen Keimen kurz nach der Exposition mit bestimmten Beta-Lactamantibiotika entspricht einer raschen Teilung noch lebensfähiger, medikamenten induzierter Bakterienfilamente.“

Stamm 8536 und Stamm 623 mit einer MHK von 2  $\mu\text{g/ml}$  zeigten eine Differenz im PA von 0,7 Stunden.

Eine Beziehung zwischen PAE und MHK bzw. MBK läßt sich bei Stamm 32 erkennen, das heißt die Resistenz gegenüber Amikacin läßt einen negativen bis keinen PAE erkennen.

Ein langer PAE spricht für eine Verlängerung des Dosierungsintervalls und der Möglichkeit der Einmaldosierung. Zu beachten ist aber, daß klinische Isolate verschieden reagieren und keine verallgemeinernden Schlüsse zulassen.

Es ist bekannt, daß Beta-Laktamantibiotika in niedrigen Konzentrationen keinen PAE auf gramnegative Stäbchen ausüben (Spivey 1992). Wir haben mit Ceftazidim in Serumspiegelkonzentration (40 µg/ml) PAE-Werte von negativ bis 2,8 Stunden erzielen können. Auch hier sind stammesspezifische Unterschiede erkennbar. Stamm 17 mit einer MHK von 1 µg/ml zeigte einen PAE von -0,3 Stunden und Stamm 8536 ebenfalls mit einer MHK von 1 µg/ml hat einen PAE von 2,4 Stunden. Stamm 32 als resistenter Stamm gegenüber Ceftazidim zeigt einen PAE von 0,5 Stunden, was bedeuten könnte, daß Stämme mit schlechter Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zu kurze Postantibiotischen Effekten neigen. Stamm 17 und 3 zeigen ebenfalls einen kurzen bis negativen PAE. Also auch hier die Schlußfolgerung, daß Klinikisolate unterschiedliche in vitro- Ergebnisse bringen.

#### 4.5 Kombination der getesteten Antibiotika

Die Kombination von Amikacin und Beta-Laktamantibiotika scheint einen synergistischen Effekt auszuüben auf *Streptokokkus faecalis* und andere gramnegative Bakterien (Gerber 1993). Die synergistische Antwort bei *Kombinationstherapien* ist in experimentellen Studien oft gezeigt worden (Hollander et al. 1996). Gudmundsson et al. (1991) machten folgende Feststellung zum PAE bei gramnegativen Stäbchen: „Wenn Kombinationspartner einzeln getestet werden erzeugen sie einen PAE. Bei Kombination dieser summieren sich diese mathematisch“.

Issakson et al. (1991) demonstrierten eine Indifferenz des PAE bei der Kombination von Ciprofloxacin und Imipenem bei *Pseudomonas aeruginosa*, jedoch bei Imipenem und Tobramycin eine synergistische Wirkung bei *Pseudomonas aeruginosa*. Die Penetration der Aminoglykoside in ihr Ziel die Ribosomen ist gesteigert wenn die Aminoglykoside mit Beta-Laktamantibiotika kombiniert werden, welche die Zellwand zerstören.

Giamarellou (1986) führte Untersuchungen zu Interaktionen von Cephalosporinen und Aminoglykosiden durch und stellte unter anderem fest, daß die Aktivität bei Kombination Amikacin plus Ceftazidim nach 2 Stunden Inkubation immer noch 98 % beträgt.

Die Kombination von Ceftazidim mit Aminoglykosiden zeigt bei 65-70 % der *Pseudomonas*-Isolate einen synergistischen Effekt. Durch die unterschiedlichen Angriffspunkte an der Bakterienzelle, Störung der Proteinsynthese bzw. Hemmung des Zellwandaufbaus haben sich Aminoglykosid-Kombinationen mit Cephalosporinen bewährt, wobei sich der ausgeprägteste Synergismus zwischen Ceftazidim und Amikacin zeigt (Giamarellou 1986).

Die Kombination beider Antibiotika bei einmaliger Exposition brachte bei Stamm 32, 623 und dem ATCC 27853 eine deutliche Verlängerung des PAE bis zur Verdopplung gegenüber der einzelnen Exposition der Antibiotika. Bei Stamm 3 ließ sich kein synergistischer Effekt beweisen.

Man könnte trotzdem die Schlußfolgerung ziehen, daß die Kombination zweier *Pseudomonas aeruginosa* wirksamer Antibiotika einen synergistischen Effekt liefert, was sich auch schon oft im klinischen Alltag bewiesen hat (Hilf et al. 1989). Außerdem könnte es sinnvoll erscheinen ein resistent oder intermediär getestetes Aminoglykosid mit einem sensiblen Antibiotikum zu kombinieren. Die Ergebnisse von Stamm 32 lassen diese Schlußfolgerung zu.

#### 4.6 PAE nach mehrfacher Antibiotikaexposition

Die dreimalige hintereinander folgende Exposition der Pseudomonas-Stämme mit beiden Antibiotika brachte unterschiedliche Ergebnisse. Beim ATCC-Stamm konnte für Amikacin alleinig keine deutliche Verlängerung des PAE beobachtet werden. Die Testung von Ceftazidim hingegen zeigt eine Zunahme des PAE über die 3 Expositionszeiten.

Bei der Kombination beider Antibiotika blieb der PAE von der 2. zur 3. Exposition annähernd gleich, was für ein Nachlassen der Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotik sprechen könnte.

Bei der 2. Testreihe fiel auf, daß sich das Inokulum von der 1. zur 3. Exposition stark verringert hat, was eine Verkürzung des PAE nach sich zieht. Für die Ermittlung des Mittelwertes zeigt das einen negativen Einfluß. Würde man diese Testreihe nicht mit einbeziehen, läßt sich doch eine Verlängerung des PAE erkennen.

In der postantibiotischen Phase kann sich folgendes physiologisches Phänomen zeigen, das der *adaptiven Resisten* . Das ist ein kurzzeitiger Effekt, der eine reduzierte bakterizide Wirkung in einer zweiten Antibiotika-Exposition nach sich zieht . Sie ist abhängig von der Antibiotikakonzentration in der 1. Exposition und wahrscheinlich das Resultat des reduzierten Transportes vom Antibiotikum in die Zelle (Mackenzie et al. 1993, Xiong et al. 1996).

Gudmundsson et al. (1994) beschreiben ebenfalls eine absteigende bakterizide Aktivität während der postantibiotischen Phase (Beta-Laktamantibiotika mehr als Aminoglykoside, bei gramnegativen Stäbchen mehr als bei Staphylokokkus aureus).

Der Stamm 3 zeigt beim Ceftazidim insgesamt eine Verlängerung des PAE von 0,37 auf 1,18 Stunden, bei der Amikacin-Testung ist keine Verlängerung des PAE zu sehen, eher eine Konstanz zu beobachten. Die Kombination von Ceftazidim und Amikacin ließ das Phänomen der *adaptiven Resisten* erkennen. Von der 1. Exposition zur 2. Exposition verringerte sich der PAE von 2,3 auf 0,9 Stunden, aber zur 3. Exposition kam es zu einem deutlichen Anstieg auf 3,25 Stunden. Die Bakterienpopulation scheint über die 3 Expositionsphasen empfindlicher geworden zu sein.

Beim Stamm 32 ließ sich die adaptive Resistenz ebenfalls zur 2. Exposition hin, bei der Testung von Amikacin und Ceftazidim alleinig und der Kombination beider erkennen. Zur 3. Exposition ist bei allen drei Testarten eine Verlängerung des PAE sichtbar. Stamm 32, der eigentlich resistent ist gegenüber Amikacin zeigt über die 3 Expositionen eine Zunahme des PAE für Amikacin was für eine Zunahme der Empfindlichkeit sprechen würde. Dies könnte eine Kombinationstherapie beider Antibiotika experimentell zulassen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Mittelwerte der Ergebnisse noch einmal dargestellt.

Tabelle 12 MHK, MBK und PAE bei verschiedenen Stämmen von  
Pseudomonas aeruginosa

Stamm	Antibiotika	MHK (µg/ml)	MBK (µg/ml)	PAE in Stunden
<b>ATCC 27853</b>	Amikacin	2,0	40	2,15
	Ceftazidi	1,0	k.M.	2,8
	Amikacin+ Ceftazidi	k.M.	k.M.	5,1
<b>3</b>	Amikacin	4,0	40	2,0
	Ceftazidi	2,0	k.M.	0,14
	Amikacin+ Ceftazidi	k.M.	k.M.	2,43
<b>32</b>	Amikacin	32	80	-0,08
	Ceftazidi	4,0	k.M.	0,5
	Amikacin+ Ceftazidi	k.M.	k.M.	2,8

k.M. = kein Meßwert

Aus der MHK kann auf den PAE geschlossen werden, da eine inverse lineare Beziehung besteht. Der Quotient MBK/MHK variiert zwischen verschiedenen Stämmen der gleichen Spezies. Munckhof et al. (1997) stellten bei Untersuchungen zum PAE an Escherichia coli-Stämmen ebenfalls eine Korrelation zwischen MHK und PAE fest.

Die Untersuchungen zum Postantibiotischen Effekt mit den klinischen Isolaten brachten nicht immer Ergebnisse der Literatur entsprechend. Für die Aminoglykoside ist es oft genug experimentell bewiesen worden, daß eine Einmalgabe möglich ist; für die Beta-Laktamantibiotika, speziell für Ceftazidim läßt sich das durch unsere Ergebnisse nicht untermauern. Eine Verlängerung des Dosierungsintervalls für Ceftazidim läßt sich nicht mit unseren Untersuchungen beweisend darstellen, so daß die 3xGabe klinisch relevant bleibt oder sogar eine Dauerinfusion anzustreben wäre.

Für Amikacin läßt sich feststellen, daß der PAE eine geringe Verlängerung über 3 Dosierungsintervalle bringt für sensibel getestete Stämme. Interessant ist, daß ein resistent getesteter Stamm über eine dreimalige Exposition mit Amikacin eine Verlängerung des PAE hervorbringt.

Somit scheint eine lang andauernde Wirkung eines Antibiotikums auf eine in vitro resistent getestete Bakterienzelle doch eine Wirkung hervorzurufen.

Initial wurde eine Bakterienstammkultur mit entsprechender Keimzahl verwendet. Dieses Inokulum wurde annähernd bei jeder nachfolgenden Exposition wieder erreicht.

Das läßt die Feststellung aufkommen, daß keine Wirkung durch das Antibiotikum erzielt

wurde. Jedoch die PAE-Werte in den einzelnen Expositionsphasen zeigen deutlich, daß die Bakterienzelle geschädigt sein muß. Aber es beweist auch erneut die Notwendigkeit der lang andauernden Therapie einer Pseudomonasinfektion.

In der Literatur finden sich wenig Angaben über die Testung des PAE in mehrmaliger Exposition. Betty et al. (1993) untersuchten den ATCC 27853 in 3facher Exposition mit Imipenem und fanden einen PAE von 2,6-2,8-2,6 h. Sie stellten fest, daß bisher die einmalige Exposition als Marker für die Festlegung des Dosierungsintervalls genommen wurde. Wie sich der PAE über mehrere Dosierungsintervalle entwickelt, dazu sind noch zahlreiche Studien notwendig.

Hollander et al. (1998) äußerten, daß in vitro Methoden zur PAE-Bestimmung keine wesentliche Bedeutung hätten. PAE-Bestimmungen in vivo hätten gewisse klinische Relevance.

Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu liefern, die Wirkung von Antibiotika experimentell zu untersuchen. Die Kenntnis über die Wirkung von Chemotherapeutika ist nach wie vor die Grundlage für die individuelle Dosierung der antimikrobiellen Therapie.

Offen bleiben die Fragen zu den genauen Mechanismen in der Bakterienzelle über mehrere Dosierungsintervalle. Hierzu sind sicher noch zahlreiche Studien notwendig.

## 5 Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Postantibiotische Effekt (PAE) von Amikacin und Ceftazidim alleinig und in Kombination beider Antibiotika nach einmaliger und mehrfacher Exposition bei *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt.

Es wurden verschiedene Stämme mit unterschiedlicher Resistenz gegen Amikacin und Ceftazidim untersucht. Die MHK-Werte bewegten sich für Ceftazidim zwischen  $< 0,25 \mu\text{g/ml}$  bis  $4 \mu\text{g/ml}$  und für Amikacin zwischen  $< 2 \mu\text{g/ml}$  bis  $32 \mu\text{g/ml}$ .

Der PAE lag nach der einmaligen Inkubation von Amikacin bei 0 bis 2,65 Stunden, von Ceftazidim bei 0 bis 2,78 Stunden und in der Kombination beider bei 2,4 bis 5,37 Stunden.

Außerdem ergab die mehrmalige Exposition bei Amikacin nach der 1. Inkubation einen PAE von 0,75 bis 2,25 Stunden und stieg auf 2,3 bis 3,5 Stunden nach der 3. Inkubation an; bei Ceftazidim von 1,1 bis 2,18 Stunden Anstieg auf 1,18 bis 2,5 Stunden und bei der Kombination von Amikacin und Ceftazidim von 2,3 bis 3,75 Stunden war ein geringer Abfall auf 1,25 bis 3,25 Stunden zu verzeichnen.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem PAE und der MHK beobachtet: je höher die Resistenz, desto kürzer der PAE.

Die Dosierungsintervalle wurden so gewählt, daß sie der klinisch üblichen dreifachen Applikation pro Tag entsprachen.

Aus unseren Untersuchungen läßt sich theoretisch eine einmalige Applikation pro Tag für Aminoglykoside und eine Kombinationstherapie Aminoglykosid plus Beta-Lactamantibiotika ableiten; vor allem auch, daß bei Mehrfachapplikation der PAE nicht kürzer wird. Für Ceftazidim erscheint eine Dauerinfusion bei fehlendem PAE sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Adam, D. Antibiotika-Kombinationen: Ein ungelöstes Problem für Mikrobiologen und Kliniker. *Infektionen und Klinikhygiene* 8. 1989, 5:35-36.
2. Armstrong, G.C., Wise, R., Brown, R.M. and Hancox, J. Comparison of Ceftazidime and Cefamandole Pharmacokinetics and Blister Fluid Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981,9: 356-358.
3. Auwera, P. Interactions between Antibiotics and Phagocytosis in Bacterial Killing. *Scand J Infect Dis.* 1991, 74:42-48.
4. Baltch, A.L., Franke, M., Smith, R.P., Asperilla, M., Griffin, P., Michelsen and Lutz, F. Serum Antibody Concentrations of Cytotoxin, Exotoxin A, Lipopolysaccharide, Protease and Elastase and Survival of Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1996, 23:1109-1116.
5. Betty, J., Mc Grath, M., Randall, C., Gilbert, D., Dudley, M.N. In Vitro Postantibiotic Effect Following Repeated Exposure to Imipenem, Temafloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 8: 1723-1725.
6. Blaser, J., Die Bedeutung des Quotienten von Spitzenkonzentration und MHK für die Wirkung von Antibiotika. *Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie.* 1990, Band 9-2:191-201.
7. Blaser, J. In-vitro und In-vivo-Untersuchungen von Antibiotika. Ursachen für Diskrepanzen. *Chemotherapie Journal.* 1995, Suppl.5:18-23.
8. Blaser, J., König, C., Once Daily Dosing of Aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995, 14:1029-1038.
9. Boswell, F.J., Andrews, J.M., and Wise, R. Pharmacodynamic Properties of BAY 12-8039 on Gram-Positive and Gram-Negative Organisms as Demonstrated by Studies of Time-Kill-Kinetics and Postantibiotics Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997, 6:1377-1379.
10. Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., Pulverer, G. *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.* 1994, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 463-472.
11. Braveny, I., Machka, K., Milatovic, D. Beurteilung neuer *Pseudomonas*-wirksamer Substanzen anhand des Serumbakterizidie-Tests. *Eur J Clin Microbiol.* 1986, 5:1-6.
12. Brook, I. Inoculum Effect. *Rev Infect Dis.* 1989, 11:361-368.
13. Bundtzen, W. R., Gerber, A.U., Cohn, D.L., Craig, W.A. Postantibiotic Suppression of Bacterial Growth. *Rev Infect Dis.* 1981, 3:28-37.
14. Bustamante, C.I., Drusano, G.L., Tatem, B.A., Stam, H.C., Postantibiotic Effect of Imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984, 11: 678-682.
15. Cappelletty, D.M., Lena Kang, S., Palmer, S.M. and Rybak, M.J. Pharmacodynamics of Ceftazidime Administered as Continuous Infusion or Intermittent Bolus Alone and in Combination with Single Daily-Dose Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995, 8: 1797-1801.
16. Ciofu, O., Giwercman, B., Pedersen, S.S. and Hoiby, N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two Decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS Suppl* 102, 1994, 674-680.

17. Craig, W.A. Interrelationship between Pharmacokinetics and Pharmacodynamics i Determining dosage regimes for Broad-Spectrum Cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995, 22: 89-96.
18. Craig, W.A., Ebert, S.C. Killing and Regrowth of Bacteria in Vitro: A Review. *Scand J Infect Dis.* 1991, 74: 63-70.
19. Dalhoff, A. Aussagekraft pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter für die Wertbemessung von Chemotherapeutika. *Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie.* 1990, Band 9-2: 175-189.
20. Drusano, G.L. Human Pharmacodynamics of Beta-lactams, Aminoglykosides and their Combination. *Scand J Infect Dis.* 1991, 74: 235-248.
21. Dudley, M.N., Zinner, S.H. Single daily dosing of amikacin in an in vitro model. *J Antimicrob Chemother.* 1991, 27: 15-19.
22. Foca, A., Carbone, M., Mastroeni, P. In vitro-Studie über die Synergistische Wirkung von Ceftriaxon in Kombination. 5th Mediterranean Congress of Chemotherapy Kairo, 26.10.-1.11.1986.
23. Fursted, Kurt. Postexposure Factors Influencing the Duration of Postantibiotic Effect: Significance of Temperature, pH, Cations, and Oxygen Tension. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997, 8: 1693-1696.
24. Gerber, A.U. Postantibiotic effect: an update and an outlook on clinical relevance. *Infect Dis.* 1993, 6: 751-757.
25. Gerber, A.U., Craig, W.A. Experimentelle Studie zur Frage des optimale Dosierungsintervalls in der Antibiotikatherapie. *Schweiz Med Wochenschr.* 1982, 112: 42-45.
26. Gerber, A.U., Kozak, S., Segessenmann, C., Flückiger, U., Bangerter, T., Greter, U. Once daily versus Thrice-Daily Administration of Netilmicin in Combination Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Man-Adapted Neutropenic animal Model. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989, 3: 233-237.
27. Giamarellou, H. Aminoglycosides plus Beta-Lactams against Gram-Negative Organisms. *Am J Med.* 1986, Vol 80 (Suppl 6B).
28. Gilbert, D.N. Once Daily Aminoglykoside Therapy- Minireview. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991, 35: 399-405.
29. Gillissen, G. Immunmodulatorische Effekte von Antibiotika allein und in Verbindung mit Immunsuppressiva. *Z Ärztl Fortbild.* 1992, 86: 263-267.
30. Gottfredsson, M., Erlendsdottir, A. and Gudmundsson, S. Different Patterns of Bacterial DNA Synthesis during Postantibiotic Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995, 39: 1314-1319.
31. Gottfredsson, M., Erlendsdottir, H., Siggfusson, A. and Gudmundsson, S. Characteristics and Dynamics of Bacterial Populations during Postantibiotic Effect Determined by Flow Cytometry. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42: 1005-1011.
32. Grassias-Berardi, L.D., Boisvon, A., Chanviere, P., Guiomar, C. In vitro- Aktivität der Kombination Ceftriaxon-Amikacin und Ceftriaxon-Piperacillin gegen *Pseudomonas aeruginosa*. 5<sup>TH</sup> Mediterranean Congress of Chemotherapy 26.10.-1.11.1986.
33. Grimm, H. In-vitro-Aktivität, Kreuzresistenz und Resistenzrends von Mezlocillin, Inhibitor geschützten Aminopenicillinen und Ampicillin. *Zeitschrift für antimikrobielle und antineoplastische Chemotherapie.* 1994, 12: 51-62.
34. Gudmundsson, S., Erlendsdottir, H., Gudmundsson, A. The Postantibiotic Effect induced by Antimicrobial Combinations. *Scand J Infect Dis.* 1991, 74: 80-93.

35. Gudmundsson, S., Vogelmann, B., Craig, W.A. Decreased bactericidal activity during the period of the postantibiotic effect. *Antimicrob Chemother*, 1994, 43: 921-930.
36. Gupta, C.B., Torre, M. Chemical Stabilities of Cefperazone Sodium and Ceftazidime in 5% Dextrose and 0,9% Sodium Chloride Injections. *J Clin Pharm Ther*, 1988, 13: 199-205.
37. Hanberger, H., Nilsson, L.E., Kihlström, E., Maller, R. Postantibiotic effect of Beta-Lactam Antibiotics on *Escherichia coli* Evaluated by Bioluminescence Assay o Bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34: 102-106.
38. Hanberger, H., Nilson, E., Maller, R., Nilsson, M. Pharmacodynamics of Beta-Lactam Antibiotics on gram-negative Bacteria: Initial Killing, Morphology and Postantibiotic Effect. *Scand J Infect Dis*, 1991, 74: 118-123.
39. Hallander, H.O., Dornbusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K., Karlson, I. Synergism between Aminoglycosides and Cephalosporins with Antipseudomonal Activity: Interaction Index and Killing Curve Method. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982, 22: 743-752.
40. Hilf, M., Yu, V.I., Sharp, J., Zuravleff, J., Korvick, J. and Muder, R. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med*, 1989 Nov, 87: 540-546
41. Hollander, J.G., Fursted, K., Verbrugh, H.A., Mouton, J.W. Duration and Clinical Relevance of Postantibiotic Effect in Relation to the Dosing Interval. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 749-754.
42. Hollander, J.G., Mouton, J.W., Goor, M-L.P.J., Vleggaar, F.P., Verbrugh, H.A. Alteration of Postantibiotic effect during one dosing Interval of Tobramycin, Simulated in an in vitro Pharmacokinetic Model. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 784-786.
43. Hollander, J.G., Mouton, J.W., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Vleggaar, F.P., Goor, M.P.J., Verbrugh, H.A. Enzymatic Method for Inactivation of Aminoglycosides during Measurement of Postantibiotic Effect. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 488-490.
44. Hooton, T.M., Blair, A.D., Turck, M., Counts, G.W. Concentrations of Aminoglycoside and Beta-Lactam Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, 4: 535-538.
45. Hostacka, A. Postantibiotic Effect and Virulence Factors Depression induced by Ciprofloxacin and by Aminoglycosides in a clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralbl Bak*, 1996, 283: 322-327.
46. Issakson, B., Hanberger, H., Maller, R., Nilsson, L.E., Nilsson, M. Synergic Postantibiotic effect of amikacin in Combination with Beta-Lactam antibiotics on gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 1991, 28: 25-34.
47. Joly-Guillou, Marie-Laure, Wolf, M., Pocard, J.J., Walker, F., and Carbon, C. Use of a New Mouse Model of *Acinetobacter baumannii* Pneumonia To Evaluate the Postantibiotic Effect of Imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 2: 345-351.
48. Kayser, F.H., Kohler, M.L. Vergleich der antimikrobiellen Aktivitäten der Cephalosporine. *Schweiz Med Wochenschr*, 1984, 114: 151-161.
49. Knothe, H. Aminoglykoside- ihr Stellenwert heute. *Medizin im Dialog*, 1996, 2: 1-4.
50. Kovarik, J.M., Hoepelmann, I.M., Verhoef, J. Once- Daily Administration: New Strategies for an Old Drug. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989, 9: 761-769.
51. Laverdiere, M., Gallimore, B., Restier, C., Poonia, K., Chow, A.W. In vitro Synergism of Ceftriaxone Combined with Aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1994, 19: 39-46.

- 52.Li, R.C., Lee, S.W., Lam, J.S. Novel Method for Assessing Postantibiotic Effect by Using the Coulter Counter. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 6: 1751-1753.
- 53.Libby, J. Postantibiotic Effect in *Escherichia coli* Determined with Real-Time Metabolic Monitoring. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 1:78-82.
- 54.Lode, H., Schaberg, T., Koeppe, P.,Borner, K. Pharmakokinetik von Antibiotika und Infektlokalisation.*J Chemother*,1995, 5: 15-17.
- 55.Lorian, V., Ernst, J., Amaral, L. The post-antibiotic effect defined by morphology. *J Antimicrob Chemother*, 1989, 23: 485-491.
- 56.Mackenzie, F.M., Gould, I.M. The Postantibiotic effect- Review. *J Antimicrob Chemother*. 1993, 32: 519-537.
- 57.Manek,N., Andrews, J.M., Wise,R. The post antibiotic effect of Imipenem. *J Antimicrob Chemother*. 1986, 18: 641-649.
- 58.Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S. Outer membrane Proteins Responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 645-649.
- 59.Mc Donald, P.J., Wetherall, Prunl, H. Postantibiotic Leukocyte Enhancement: Increased Susceptibility of Bacteria Pretreated with Antibiotics to Activity of Leukocytes. *Rev Infect Dis*, 1981, 3: 38-44.
- 60.Mc Grath, B.J., Marchbanks, C.R., Gilbert, D., Dudley, M.N. In vitro Postantibiotic Effect Following Repeated Exposure to Imipenem, Temafloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37: 1723-1725.
- 61.Meunier, F., Auwera, P., Aoun, M., Ibrahim, S., Tulkans, P.M. Empirical antimicrobial therapy with a single daily dose of ceftriaxone plus amikacin in febrile granulocytopenie patients: a pilot study. *J Antimicrob Chemother*, 1991, 27: 129-139.
- 62.Moore, R.D., Craig, R.S., Lietmann,P.S. The Association of Aminoglycosides Plasma Levels with Mortality in Patients with gram-negative Bacteremia. *J Infect Dis*, 1984, 149: 443-448.
- 63.Munckhof, W., Olden, D. and Turnidge, J. The Postantibiotic Effect of Imipenem: Relationship with Drug Concentration, Duration of Exposure, and MIC. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 8: 1735-1737.
- 64.Naber, K.G., Wiedemann, B. Bewertungskriterien für die antimikrobiell Chemotherapie. *Chemotherapie Journal*, 1994, 2: 47-52.
- 65.Odenholt, I., Isaksson, B., Nilsson, L., Cars, O. Postantibiotic and Bactericidal Effect of Imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microb Infect Dis*, 1989, 2: 136-141.
- 66.Odenholt-Tornqvist, I., Löwdin, E., Lars, O. Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of Beta-Lactam-Antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35: 1834-1839.
- 67.Piepersberg, W. Aminoglycosid-Antibiotika: Wichtige Therapeutika und Objekte der Grundlagenforschung. *Forum Mikrobiologie*, 1985, 8: 153-161.
- 68.Potel, G., Chau, N.P., Pangon, B., Fautin, B., Vallois, J.M., Faurisson, F., Carbon,C. Single Daily Dosing of Antibiotics: Importance of in vitro Killing rate, Serum Half-Life, and Protein Binding. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35: 2085-2090.
- 69.Raz,R., Adawie,M., Romano,S. Intravenous Administration of Gentamicin Once Daily versus Thrice Daily in Adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995, 14:88-91
- 70.Ronald, C.LI and SIU W. LEE. Postantibiotic Effect Assessments for Antibiotics Ehibiting a Wide Range of Bactericidal Activities by Using a Modified Total-Cell-

- Counting Method. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 5: 1170-1172.
71. Ronald C.LI, ZHE Y. ZHU, SIU W. LEE, Kenneth Raymond, Julia M.L Ling, and Augustine F.B.Cheng. Antibiotic Exposure and Its Relationship to Postantibiotic Effect and Bactericidal Activity: Constant versus Exponentially Decreasing Tobramycin Concentrations against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 8: 1808-1811
  72. Sarubbi, F.A., Hull, J.H. Amikacin Serum Concentrations: Prediction of Levels and Dosage Guidelines. *Ann Intern Med*, 1978, 89: 612-618.
  73. Schmid, E.N. Feinstrukturelle Veränderungen der Bakterienzelle unter Fosfomycin-Einwirkung. *Berichtsband der Fosfomycin-Arbeitstagung*, 1984, 41-45.
  74. Sörgel, F., Kinzig, M. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik parenteraler Cephalosporine. *Chemotherapie Journal*, 1995, 5: 6-13.
  75. Spivey, J.M. The Postantibiotic effect. *Clinical Pharmacy*, 1992, 11: 865-875.
  76. Sturm, A.W. Netilmicin-Therapie der gramnegativen Sepsis- Einmaldosierung wirksa und verträglich. *J Infect Dis*. 1989, 159: 931-937.
  77. Suller, M. and Lloyd, D. Flow Cytometric Assessment of the Postantibiotic Effect of Methicillin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 5: 1195-1199.
  78. Thorburn, C.E., Molesworth, S.J., Sutherland, R. and Rittenhouse, S. Postantibiotic and Post-Beta-Lactamase Inhibitor Effects of Amoxicillin plus Clavulanate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 2796-2801.
  79. Vogelmann, B., Craig, W.A. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr*, 1986, 108: 835-840.
  80. Wallrauch-Schwarz, C., Milatovic, D., Braveny, I. Bewertung des Bakterizidietestes. *Arzneimittel-Forschung*, 1993, 43: 1378-1381.
  81. Wiedemann, B. Qualität eines Antibiotikums-Beurteilung mit in vitro Daten. *Chemotherapie Journal*, 1995, 5: 2-5.
  82. Wiedemann, B. Resistenzmechanismen und ihre Ausbreitung. *Arzneimitteltherapie*, 1992, Nr.12.
  83. Wiedemann, B., Heisig, P. Beurteilung der Resistenzentwicklung als Faktor für die Einschränkung therapeutischer Möglichkeiten. *Infection*, 1991, 1:47-50.
  84. Zielmann, S. Methode zur individuellen Anpasung der einmal täglichen Dosierung von Aminoglykosidantibiotika. *Chemotherapie Journal*, 1995, 2: 61-62.
  85. Zielmann, S., Lotterer, E. Grundlagen und Durchführung einer individuellen Therapie mit Aminoglykosidantibiotika. *Intensivmedizin*, 1991, 28: 124-132.
  86. Xiong, Y.Q., Caillon, J., Drugeon, H. Potel, G., Baron, D. Influence of pH on Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglykosides and their Postantibiotic Effect. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 35-39.
  87. DIN Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Beuth Verlag 1992

## Danksagung

---

Herrn Privatdozent Dr. med. W. Bär danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Sachmittel am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Carl-Thiem-Klinikums in Cottbus.

Er gab mir jederzeit eine umfassende und engagierte Unterstützung während der Fertigstellung der Dissertation.

Zusätzlich danke ich allen Kolleginnen des Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft.

## Erklärung an Eides Statt

---

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation ohne die Hilfe Dritter selbständig verfaßt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, Dezember 1998

Heike Hummel

## Lebenslauf

Name: Heike Hummel

Geburtsdatum: 16.09.1962

Geburtsort: Crimmitschau

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung: 1969-1977 Allgemeinbildende Oberschule  
1977-1981 Erweiterte Oberschule mit  
Abiturabschluß

1981-1982 Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Schmölln

Hochschulstudium: Medizin - Karl-Marx-Universität Leipzig  
1982-1984  
Medizinische Akademie Erfurt 1984-1989  
Abschluß: Diplommediziner  
13.02.1989 Erteilung der Approbation

Berufstätigkeit: 13.02.1989 Beginn der Ausbildung zum Facharzt für  
Kinderheilkunde am Carl-Thiem-Klinikum Cottbus  
  
01.01.1993 Wechsel der Facharztrichtung und Beginn der  
Facharztausbildung am Institut für Mikrobiologie und  
Krankenhaushygiene des Carl-Thiem-Klinikum  
  
seit 12.02.1997 Fachärztin für Mikrobiologie und  
Infektionsepidemiologie  
  
seit März 1997 vertragsärztliche Tätigkeit, bestätigte  
Niederlassung ab Juni 1997 im Institut für Laboratoriumsmedizi  
Dr. Scholz & Partner in Neukirchen (bei Chemnitz)

Goldschau, den 18.12.1998