

Carbapenem-resistente Harnwegsinfektionen
Erhöhte Effektivität der Behandlung durch Antibiotikakombinationen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Link, Isabell Anna
aus Heidelberg

Gießen 2021

Carbapenem-resistente Harnwegsinfektionen
Erhöhte Effektivität der Behandlung durch Antibiotikakombinationen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Link, Isabell Anna
aus Heidelberg

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner
Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Thomas Bschleipfer

Tag der Disputation: 01.02.2022

„Wir können diese Welt nicht ändern, bevor sich nicht die Individuen ändern.“

- Marie Skłodowska Curie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Grundlagen	S. 2
1.1.1 Harnwegsinfektionen	S. 2
1.1.1.1 Diagnostik von Harnwegsinfektionen	S. 3
1.1.1.2 Erregerspektrum von Harnwegsinfektionen	S. 4
1.1.1.3 Therapie von Harnwegsinfektionen	S. 4
1.1.1.4 Erregersensibilität und Resistenzlage bei Harnwegsinfektionen in Deutschland	S. 8
1.1.2 Carbapeneme	S. 10
1.1.2.1 Allgemeines, Wirkmechanismus und Wirkspektrum	S. 10
1.1.2.2 Resistenzen gegen Carbapeneme- Mechanismen und Vorkommen	S. 11
1.1.2.3 Klasse A-D Carbapenemasen	S. 13
1.1.2.4 Kreuzresistenzen bei CRE	S. 15
1.1.2.5 Behandlungsstrategien Carbapenem-resistenter Erreger	S. 15
1.1.2.6 Präventionsstrategien zur Vermeidung der Entstehung von Carbapenemresistenzen	S. 19
1.2 Zielsetzung	S. 19
2. Material und Methoden	S. 21
2.1 Materialien	S. 21
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme	S. 21
2.1.2 Verwendete Antibiotika	S. 22
2.1.3 Verwendete Reagenzien	S. 23
2.1.4 Verwendete Utensilien	S. 24
2.1.5 Verwendete Geräte	S. 25
2.1.6 Verwendete Lösungen	S. 26
2.2 Methoden	S. 28
2.2.1 Bestimmung MIC & MBC	S. 28
2.2.2 Kombinationstestung zur Detektion synergistisch wirkender Antibiotika, Checkerboard-Assays	S. 30
2.2.3 Simulation physiologischer Verhältnisse in einem dynamischen Blasen-Modell	S. 32
2.2.4 Bestimmung der Antibiotikakonzentration	S. 36
2.2.5 Statistische Analysen	S. 37

3. Ergebnisse	S. 38
3.1 MIC- und MBC-Bestimmung	S. 38
3.2 Checkerboard-Assays	S. 44
3.3 Dynamisches Blasen-Modell	S. 51
4. Diskussion	S. 61
4.1 MIC-Bestimmung	S. 62
4.2 Checkerboard-Assays	S. 63
4.3 Dynamisches Blasen-Modell	S. 64
5. Zusammenfassung/Conclusion	S. 71
6. Abkürzungsverzeichnis	S. 75
7. Abbildungsverzeichnis	S. 76
8. Tabellenverzeichnis	S. 77
9. Literaturverzeichnis	S. 79
10. Publikationsverzeichnis	S. 94
11. Ehrenwörtliche Erklärung	S. 95
12. Danksagung	S. 96

1. Einleitung

„Die Zeit wird kommen, in der Penicillin von jedermann in Geschäften gekauft werden kann. Dadurch besteht die Gefahr, dass der Unwissende das Penicillin in zu niedrigen Dosen verwendet. Indem er die Mikroben nun nicht-tödlichen Mengen aussetzt, macht er sie resistent.“

Alexander Fleming, 1945. (Heudorf et al. 2016)

Alexander Fleming prophezeite bereits als er 1945 mit dem Nobelpreis für die Entdeckung von Penicillin ausgezeichnet wurde, die Entstehung von Antibiotikaresistenzen. 75 Jahre später listet die Weltgesundheitsorganisation die Antibiotikaresistenzen wiederholt in ihren Top 10 der größten Gefahren für die globale Gesundheit und Forscher*innen¹ sind sich einig, dass diese eine globale Gesundheitskrise darstellen (WHO 2019). Harnwegsinfektionen (HWI) und Urosepsis, meist durch *Enterobacteriaceae* ausgelöst, stellen sowohl im ambulanten als auch im stationären Bereich der Krankenversorgung einen der häufigsten Gründe für die Verordnung von Antibiotika dar. Dadurch sind sie auch mitverantwortlich für die Entstehung immer weiterer Antibiotikaresistenzen. In Europa sind Resistenzen uropathogener Keime gegenüber β -Laktamantibiotika, Fluorchinolonen und Aminoglykosiden bereits weit verbreitet (Wagenlehner und Naber 2004). Es werden daher zur Behandlung von Harnwegsinfektionen immer öfter auch Carbapeneme eingesetzt, welche als Reserveantibiotika häufig den letzten vielversprechenden Therapieansatz bilden. Durch den vermehrten Einsatz kommt es auch hier zur Entstehung von Resistenzen und Carbapenem-resistente Enterobakterien (CRE) sind in Europa ebenfalls auf dem Vormarsch (European Centre for Disease Prevention and Control 2017). CRE verursachen neben Atemwegsinfektionen am häufigsten Infektionen der Harnwege (Center for Disease Control and Prevention 2019). Daraus ergibt sich ein akuter Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von Harnwegsinfektionen und CRE im Allgemeinen. Dadurch soll neben einer optimalen Behandlung der erkrankten Personen vor allem das Auftreten von Komplikationen wie einer Urosepsis und die Entstehung neuer Resistenzen verhindert werden. Forscher*innen arbeiten verschärft an dem Versuch, neue Antibiotika mit neuen

¹ „Das Sternchen „*“, das in dieser Arbeit als eine mögliche geschlechtersensibilisierende Sprachform verwendet wird, repräsentiert eine Leerstelle, die von Menschen mit geschlechtlicher Selbstpositionierung jenseits von „Mann“ und „Frau“ gefüllt werden kann.“ (Student*innenschaft der Philipps-Universität Marburg 06/2017, S. 37)

Wirkmechanismen zu entwickeln, gegen die bisher noch keine Resistenzmechanismen entstehen konnten (Kern 2018).

Wenige dieser Bestrebungen scheinen zeitnah Resultate liefern zu können. Es werden daher zur Therapie komplizierter Infektionen häufig bereits erprobte Antibiotika in Kombination eingesetzt. Die Studienlage hierzu ist allerdings lückenhaft und über die genauen Effekte der Kombination ist häufig wenig bekannt (Paul et al. 2014). Brochado et al. konnten kürzlich sogar zeigen, dass eingesetzte Antibiotikakombinationen nicht selten antagonistische Effekte aufweisen und es unter dem durch den Einsatz mehrerer Antibiotika erhöhten Selektionsdruck zu einer vermehrten Resistenzbildung kommen kann (Brochado et al. 2018).

1.1. Grundlagen

1.1.1 Harnwegsinfektionen

Als HWI wird „eine symptomatische Entzündung der Harnwege, ausgelöst durch eine bakterielle Besiedlung“ (Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin 2018) bezeichnet. Hierbei werden unterschiedliche Einteilungen vorgenommen.

Zum einen werden unkomplizierte von komplizierten Harnwegsinfektionen unterschieden. Als unkompliziert wird eine HWI bezeichnet, wenn im Harntrakt keine relevanten funktionellen oder anatomischen Anomalien, keine relevanten Nierenfunktionsstörungen und keine relevanten Begleiterkrankungen / Differentialdiagnosen vorliegen (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017). Im Gegensatz dazu wird eine HWI als kompliziert bezeichnet, wenn beispielsweise Stenosen des Harnleiters, ein einliegender Blasenkatheter oder eine abflussbehindernde Prostatahyperplasie vorliegen (vgl. Tabelle 1). Jede Harnwegsinfektion beim Mann wird außerdem als kompliziert bezeichnet. Unkomplizierte Harnwegsinfektionen treten weitaus häufiger auf (Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin 2018, 2018).

Tabelle 1: Komplizierende Faktoren von Harnwegsinfektionen, modifiziert nach AWMF Leitlinie (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017)

Anatomische Veränderungen	Funktionelle Veränderungen
angeboren	Niereninsuffizienz
Ureterabgangsstenose	Entleerungsstörung der Harnblase
Harnblasendivertikel	Störungen des Immunsystems (HIV)
Harnröhrenklappen	Harnblasenkatheter
erworben	Harnleiterschiene
Nieren-, Harnleitersteine	Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie
Harnblasentumore	Detrusor-Sphinkter-Dyskoordination
Prostatahyperplasie	Nephrostomie

Des Weiteren werden obere von unteren Harnwegsinfektionen unterschieden. Eine obere HWI bezeichnet eine Pyelonephritis, bei der es häufiger zu Fieber kommt. Auch Flankenschmerzen sprechen für eine obere HWI. Eine untere Harnwegsinfektion bezeichnet eine Zystitis. Die häufigsten Symptome von Harnwegsinfektionen sind Dysurie (schmerzhafte Miktion) und Pollakisurie (vermehrter Harndrang).

Davon abzugrenzen ist die asymptomatische Bakteriurie, welche eine Keimbesiedlung ohne klinische Symptome bezeichnet (Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin 2018). Frauen sind weitaus häufiger von Harnwegsinfektionen betroffen. Laut Butler et al. leiden 37% aller befragten Frauen in ihrem Leben unter einer HWI, 79% davon sogar mehrmals (Butler CC et al. 2015). Die Prävalenz von Harnwegsinfektionen ist in der Gruppe der 80-jährigen Frauen am höchsten (Dicheva 2015).

1.1.1.1 Diagnostik von Harnwegsinfektionen

Zur Diagnose einer HWI sollte zunächst eine gründliche Anamnese erfolgen. Hier sollte vor allem auf die Beschwerden der Patient*innen und das Vorliegen eventueller komplizierender Faktoren (Tabelle 1) geachtet werden. Die anschließende weitere Diagnostik richtet sich nach der vorliegenden Patient*innengruppe. Hier wird zwischen prä- und postmenopausalen Frauen, schwangeren und nicht schwangeren Frauen, gesunden oder chronisch kranken Personen sowie zwischen Männern und Frauen unterschieden. Bei prämenopausalen, nicht schwangeren gesunden Frauen kann bei eindeutigen Beschwerden ohne weitere Diagnostik von einer unkomplizierten HWI ausgegangen werden. Bei Hinweisen auf eine komplizierte HWI sollte zusätzlich eine körperliche Untersuchung und Urinuntersuchung sowie eine Sonographie durchgeführt

werden. Als Goldstandard gilt die Urinuntersuchung von vorzugsweise Mittelstrahlurin inklusive einer Urinkultur. Bezüglich der Erregerzahlen ist ab einer Zahl von 10^3 – 10^4 kolonienbildender Einheiten (CFU) /ml Reinkultur uropathogener Keime von einer HWI auszugehen. Im Falle von Harnblasenpunktaten gilt jeglicher Erregernachweis als signifikant. (Naber, K. G., et al 2011). Vor allem bei einer komplizierten HWI sollte vor Einleitung einer antibiotischen Therapie immer eine Urinkultur angelegt werden (Sk2 Leitlinie 2018). Besonders auch die Urinmikroskopie stellt eine sichere Diagnosemethode für Harnwegsinfektionen da (Naber, K. G., et al 2011).

1.1.1.2 Erregerspektrum von Harnwegsinfektionen

Der häufigste Erreger der unkomplizierten Zystitis ist in Deutschland laut Auswertung der ARESC-Studie mit 76,7% das gram-negative Enterobakterium *Escherichia coli*, gefolgt von *Proteus mirabilis* (4,7%) und *Staphylococcus saprophyticus* (2,8%) sowie *Klebsiella pneumoniae* (2,5 %). Die Spezies *Enterobacter* verursacht 1,3 % der Infektionen. Es überwiegen gram-negative Erreger mit 87,4% der Harnwegsinfektionen (Wagenlehner 2010).

Infektionsmechanismus ist meist ein Aufstieg pathogener Keime über die Urethra. Dies erklärt auch, weshalb Frauen häufiger von HWI betroffen sind, da die Harnröhre bei Frauen in der Regel kürzer ist als bei Männern.

Im Falle komplizierter HWI zeigt sich ein größeres Erregerspektrum, welches u.a. *Pseudomonas aeruginosa* einschließt. *E. coli* ist allerdings auch hier der am häufigsten beobachtete Erreger, wenn auch andere Enterobacteriaceae gehäuft vorkommen können (S2k Leitlinie 2018). Das Vorkommen von Resistenzen ist bei komplizierten Harnwegsinfektionen häufiger (Grabe 2015). Im Falle nosokomialer Infektionen treten gehäuft *Enterokokken*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter* sowie *Citrobacter* auf. Außerdem kommt es häufiger zu Mischinfektionen (Herold 2016).

1.1.1.3 Therapie von Harnwegsinfektionen

Vor Therapiestart ist die Therapieindikation zu prüfen. Hierbei spielt vor allem der Faktor der Spontanheilung eine zentrale Rolle. Bei unkomplizierten HWI ist mit einer Spontanheilungsrate von bis zum 50% zu rechnen. Hieraus folgt, dass mit einer Therapie vorwiegend die subjektive Krankheitslast gesenkt werden kann. Studien zeigten, dass es durch eine Antibiotikatherapie signifikant schneller zu einer Besserung der Symptomatik und damit zu einer Linderung der Beschwerden kam. Vergleicht man jedoch die rein analgetische Therapie mit einer antibiotischen Therapie, so kommen

einige Studien zu dem Schluss, dass diese Therapieformen als gleichwertig angesehen werden können (Bleidorn et al. 2010). Es ist also möglich, den Patient*innen, falls gewünscht, eine rein symptomatische Therapie anzubieten. Ebenso sind die Wünsche der Patient*innen zu berücksichtigen. Zu einer antibiotischen Therapie sollte im Hinblick auf die Entwicklung einer komplikationsreicheren Pyelonephritis jedoch geraten werden, der Einsatz und die Wahl des Antibiotikums sollte im Hinblick auf Resistenzentwicklungen aber immer kritisch geprüft werden (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017). Zur symptomatischen Therapie bieten sich Analgetika und Spasmolytika sowie die Empfehlung einer erhöhten Trinkmenge und regelmäßiger Toilettengänge zur häufigen Entleerung der Blase an (Herold 2016). Im Falle komplizierter HWI oder Pyelonephritiden ist immer zu einer Antibiotikatherapie zu raten.

Bevorzugte Therapieform ist, wenn möglich, die orale Gabe. Die Kurzzeittherapie über ein bis drei Tage ist bei besserer Compliance und geringerem Selektionsdruck resistenter Keime der Normalflora der Langzeittherapie vorzuziehen (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017).

Bei der Auswahl des geeigneten Antibiotikums spielen laut der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Leitlinie zu Harnwegsinfektionen folgende Faktoren eine Rolle:

- individuelles Risiko (Allergien, Alter, Geschlecht, Gesamtmorbidität)
- zu erwartendes Erregerspektrum und -empfindlichkeit gegenüber den zu Verfügung stehenden Antibiotika
- unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen
- Auswirkungen auf die individuelle und allgemeine Resistenzsituation

Die prinzipiell für die Therapie von HWI in Frage kommenden Antibiotika(/-gruppen) sind Fosfomycin, Nitrofurantoin, Cotrimoxazol, Aminopenicilline in Kombination mit β -Laktamaseinhibitoren, Cephalosporine der 2. und 3. Generation sowie Fluorchinolone. Die beiden letzteren bergen jedoch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer *Clostridium-difficile*-Infektion durch Beeinträchtigung der physiologischen Darmflora (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017). Allgemein sollte auf genügende renale Ausscheidung des Antibiotikums geachtet werden, um zu gewährleisten, dass das eingesetzte Antibiotikum an seinen Wirkort gelangen kann (Sk2 Leitlinie 2018). Des Weiteren gehören Cephalosporine und Fluorchinolone zu den relevantesten Antibiotikagruppen in der Therapie von bakteriellen Infektionen, darunter häufige oder kritische Krankheitsbilder wie Pneumonie, Sepsis oder Peritonitis sowie schwer behandelbare Keime wie *Pseudomonas* oder Methicillin-resistenter *Staphylococcus*

aureus (MRSA). Eine Resistenzentwicklung wäre hier als besonders kritisch anzusehen. Außerdem führen Fluorchinolone mit der möglichen Entwicklung einer QT-Zeit-Verlängerung und Neurotoxizität zu relevanten Arzneimittelnebenwirkungen. Daher sollten diese beiden Antibiotikagruppen nicht als erste Wahl in der Therapie der unkomplizierten Zystitis eingesetzt werden. Auch für viele der anderen genannten Antibiotikagruppen liegen verschiedene Gründe, darunter unzureichende Empfindlichkeit der Erreger in Deutschland oder zu geringe orale Bioverfügbarkeit, vor, die gegen den Einsatz als Erstlinientherapie sprechen (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017).

Bezüglich der Erstlinientherapie der Zystitis sollte vorzugsweise eines der folgenden Antibiotika eingesetzt werden: Fosfomycin, Nitrofurantoin, Nitroxolin, Pivmecillinamin, Trimethoprim (siehe Tabelle 2). Im Falle der akuten Pyelonephritis sollten individuelle Risikofaktoren und die regionale Resistenzlage mit einbezogen werden. Zur Auswahl stehen Cefpodoxim, Ciprofloxacin und Levofloxacin. Bei schweren Verläufen kann neben den genannten Antibiotika in parenteraler Applikationsform auch Ceftriaxon eingesetzt werden. Zweitlinientherapeutika wie Amoxicillin/Clavulansäure, Ertapenem, Gentamicin, Meropenem oder Piperacillin/Tazobactam können bei zu erwartenden Resistenzen des vermuteten Erregers angewendet werden.

In Bezug auf die komplizierte HWI sollte zu Beginn bei der Entscheidung, ob eine initiale parenterale Therapie erforderlich ist, der allgemeine klinische Zustand des/der Patient*in beachtet werden. Hierzu können auch Laborparameter wie CRP und Procalcitonin genutzt werden. Außerdem sollte beachtet werden, dass eine Therapie nur erfolgversprechend sein kann, wenn die komplizierenden und auslösenden Faktoren entfernt oder zumindest verbessert werden (Sk2 Leitlinie 2018).

Für die initiale Therapie einer komplizierten HWI kommen folgende Antibiotika in Betracht: Cephalosporine der Gruppe 3a, Fluorchinolone und Aminopenicilline in Kombination mit einem Betalaktamaseinhibitor. Besteht ein erhöhtes Risiko für MRE, können außerdem Cephalosporine in Kombination mit einem Betalaktamaseinhibitor oder Ertapenem eingesetzt werden. Bei nosokomialen HWI oder HWI bei Patient*innen mit einliegendem Urindauerkatheter ist das erhöhte Risiko für komplizierte Erreger zu beachten. Hier können Cephalosporine der Gruppe 3b, gegebenenfalls mit Betalaktamaseinhibitor, Fluorchinolone der Gruppen 2 und 3 sowie Meropenem der Imipenem eingesetzt werden. Gegebenenfalls kann diese Therapie mit der Kombination aus einem Aminopenicillin und einem Betalaktamaseinhibitor ergänzt werden, um die Enterokokkenlücke zu schließen (Sk2 Leitlinie 2018).

Eine Therapie der asymptomatischen Bakteriurie sollte nicht erfolgen. Ausgenommen sind Schwangere. In Frage kommen Penicillinderivate, Cephalosporine und Fosfomycin.

Andere Gruppen sollten wegen eventuell fetotoxischer Wirkung nicht eingesetzt werden. Zur Prävention bei rezidivierenden HWI stehen nicht medikamentöse Verfahren wie eine ausreichende Trinkmenge, sexuelle Abstinenz, Hygienemaßnahmen, Phytotherapeutika oder vaginale Estriolbehandlung zur Verfügung. Falls nötig ist eine antibiotische Langzeitprophylaxe mittels Ciprofloxacin, Norfloxacin oder Nitrofurantoin möglich (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017).

Tabelle 2: Therapieempfehlungen für unkomplizierte HWI mit Angabe von Dosierung und Therapiedauer. Des weiteren sind die Therapievorschläge nach Erregerempfindlichkeit, Nebenwirkungen und zu erwartenden Kollateralschäden bewertet. Übernommen aus AWMF Leitlinie (Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017)

Substanz	Tagesdosierung	Dauer	Eradikationsrate bei sensiblen Erregern	Empfindlichkeit	Kollateralschäden	Sicherheit/Geringe Nebenwirkungen (UAW)
Folgende Antibiotika sollen bei der Therapie der unkomplizierter Zystitis vorzugsweise eingesetzt werden:						
Fosfomycin-Trometamol [144,256]	3000mg 1 ×	1 Tag	++	+++	+++	+++
Nitrofurantoin [185,545]	50mg 4 × tgl.	7 Tage	+++	+++	+++	++
Nitrofurantoin RT [505] Retardform (= Makrokristalline Form)	100mg 2 × tgl.	5 Tage	+++	+++	+++	++
Nitroxolin [386]	250mg 3 × tgl.	5 Tage	+++	+++	+++	+++
Pivmecillinam [398,441]	400mg 2-3 × tgl.	3 Tage	+++	+++	+++	+++
Trimethoprim soll nicht als Mittel der ersten Wahl eingesetzt werden, wenn die lokale Resistenzsituation von Escherichia coli >20% liegt.						
Trimethoprim [285]	200mg 2 × tgl.	3 Tage	+++	+(+)	++	++(+)
Folgende Antibiotika sollen bei der Therapie der unkomplizierter Zystitis NICHT als Mittel der ersten Wahl eingesetzt werden:						
Cefpodoxim-Proxetil [230]	100mg 2 × tgl.	3 Tage	++	++	+	+++
Ciprofloxacin [145,230,231]	250mg 2 × tgl.	3 Tage	+++	++	+	++
Cotrimoxazol [227]	160/800mg 2 × tgl.	3 Tage	+++	+(+)	++	++
Levofloxacin [145,448]	250mg 1 × tgl.	3 Tage	+++	++	+	++
Norfloxacin [145,396,398]	400mg 2 × tgl.	3 Tage	+++	++	+	++
Ofloxacin [145,227]	200mg 2 × tgl.	3 Tage	+++	++	+	++
Zeichenerklärung	Eradikation	Empfindlichkeit	Kollateralschaden		Sicherheit/Geringe Nebenwirkungen (UAW)	
+++	>90%	>90%	wenig Selektion multiresistenter Erreger, wenig Resistenzentwicklung gegenüber der eigenen Antibiotikaklasse		Hohe Sicherheit, geringe UAW	
++	80-90%	80-90%	wenig Selektion multiresistenter Erreger, Resistenzentwicklung gegenüber der eigenen Antibiotikaklasse		Schwere UAW möglich	
+	<80%	<80%	Selektion multiresistenter Erreger, Resistenzentwicklung gegenüber der eigenen Antibiotikaklasse		n.a.	

1.1.1.4 Erregersensibilität und Resistenzlage bei Harnwegsinfektionen in Deutschland

Während Hampel et al. 2003 bei ihrem Mainzer Patient*innenkollektiv auf alarmierende Resistenzraten und Kreuzresistenzen der Erreger von HWI gegenüber den damals noch neuartigen Fluorchinolonen hinwiesen und eine Resistenzrate der Keime gegenüber Levofloxacin von 15-27% beobachteten (Hampel et al. 2003), galten Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen 2014 bereits weltweit als verbreitet und Fluorchinolone daher nicht mehr als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung von Harnwegsinfektionen (Wagenlehner et al. 2014). Wagenlehner et al. konnten in ihrer 2014 erschienenen Analyse der Resistenzlage in Deutschland ein stabiles Erregerspektrum sowie eine ebenso stabile Resistenzlage postulieren. Außerdem konnten schon damals zunehmende Resistenzen gegenüber Carbapenemen verzeichnet werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Die von Wagenlehner et al. festgestellten Resistenzen in % der 4 getesteten Bakterienspezies gegenüber 6 häufig in der Behandlung von HWI eingesetzten Antibiotika. Adaptiert nach (Wagenlehner et al. 2014)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Ampicillin/Betalaktamaseinh.	42	51	21	-
Piperacillin/Tazobactam	21	32	15	23
Ciprofloxacin	15	41	69	52
Cefotaxim	15	34	-	-
Gentamicin	18	40	80	49
Imipenem	4	0	18	21

P. Heisig führte die zunehmenden Resistenzen gegenüber den bakteriziden Fluorchinolonen auf Punktmutationen zurück und konnte vermehrt neue, plasmidcodierte Resistenzmechanismen wie Topoisomerase-Schutzproteine, Chinoloneffluxpumpen und die plasmidcodierte Chinolonresistenz AAC6'-Ib-cr als „Schrittmacher für die Entstehung hoher Fluorchinolonresistenzen“ beobachten (Heisig 2010, S. 616). Außerdem fiel ein großer Anteil an Keimen auf, der neben der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen eine Vielzahl weiterer Resistenzen im Sinne einer Multiresistenz aufwies (Heisig 2010). Im Hinblick auf β -Laktamantibiotika wurden Resistenzen von circa 30% verzeichnet, welche sich durch den Einsatz eines Betalaktamaseinhibitors jedoch auf circa 3% senken ließen. Wagenlehner et al. erzielten ähnliche Ergebnisse und beobachteten die geringsten Resistenzraten für die Kombination aus Piperacillin und Tazobactam (Wagenlehner et al. 2003).

Alle untersuchten Quellen kommen bezüglich der in der aktuellen Leitlinie zur Behandlung der unkomplizierten Zystitis empfohlenen Antibiotika (Nitrofurantoin, Fosfomycin) zu dem Ergebnis, dass aktuell hier noch wenig Resistenzbildung erfolgt ist. Der Einsatz von Nitrofurantoin und Fosfomycin in der Erstlinientherapie ist daher gut belegt. In Europa wird die Resistenzrate für die genannten Antibiotika mit 0,7% angegeben (Heisig 2010). Dies wird auf das Fehlen transferierbarer Resistenzmechanismen zurückgeführt. Außerdem kommt es beim Einsatz von Nitrofurantoin und Fosfomycin zu weniger Kollateralschäden im Sinne der Entwicklung von Kreuzresistenzen oder Selektion multiresistenter Keime (Heßdörfer 2016). Zu beachten ist jedoch die natürliche Resistenz von *P. mirabilis* gegenüber Nitrofurantoin (Marcon et al. 2017). Die Behandlungsempfehlungen in der aktuellen Leitlinie zur Therapie von HWI entstanden auf Basis der Analyse verschiedener Studien, die sich mit der Resistenzlage und Erregersensibilität beschäftigten (ARESC-Studie, REHIP Studie, RKI, LORE-Studie, Tabelle 4). Zu beachten ist hierbei allerdings, dass lediglich eine Analyse von *E. coli*-verursachten Harnwegsinfektionen stattgefunden hat. Zwar bleibt *E. coli* hauptverantwortlich für einen Großteil der Harnwegsinfektionen, der Anteil ist jedoch stark schwankend.

Tabelle 4: Resistenzen für *E. coli* gegenüber den getesteten Antibiotika, Angaben in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den 4 Studien, auf deren Basis die Therapieempfehlungen zur Behandlung von HWI in der aktuellen Leitlinie entstanden sind, adaptiert nach AWMF Leitlinie (*Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2017*).

	ARESC ¹	REHIP ²	LORE ³	RKI ⁴
Ampicillin	35		60	48
Amoxiclav	1		56	29
Cefuroxim	0,4			10
Ciprofloxacin	4,5	8,7	5	15
Cotrim	26		16	23
Fosfomycin	0,8	4,5	0	1,3
Mecillinam	1			
Nitrofurantoin	4,5	2,2	1	1,3
Trimethoprim		17,5		
Meropenem			0	
Cefpodoxim			3	9
Piperacillin			32	
Nalidixinat	9,4			

¹Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis, Schito et al., 2009

²Resistance profiles of urinary tract infections in general practice - an observational study, Schmiemann et al., 2012

³Local Resistance profile of bacterial isolates in uncomplicated urinary tract infections, Zwirner et al., 2016

⁴ Robert Koch Institut

Die der Leitlinie zugrunde gelegten Studien weisen somit hohe Resistenzraten für Fluorchinolone und Betalaktamantibiotika sowie niedrig Raten für Fosfomycin und Nitrofurantoin nach.

1.1.2 Carbapeneme

1.1.2.1 Allgemeines, Wirkmechanismus und Wirkspektrum

Carbapeneme zählen zu den β -Laktamantibiotika. Sie wirken bakterizid, indem sie nach Eindringen in die Bakterienzelle durch Porine die Zellwandsynthese der Bakterien über eine Blockade der Quervernetzung von Peptidoglykanketten durch Penicillin-Bindungs-Proteine (PBPs) hemmen. Ihr Wirkspektrum umfasst sowohl gram-negative als auch gram-positive Erreger und sie sind gegen die meisten Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL)-Bildner wirksam. Sie werden daher als Breitspektrumantibiotika vor allem in der Therapie kritisch kranker Patient*innen eingesetzt. Den Carbapenemen gemein ist ihre den Penicillinen ähnliche Ringstruktur mit einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 und dem Ersatz des Kohlenstoffs an C1 durch Schwefel (Abb. 1) (Papp-Wallace et al. 2011).

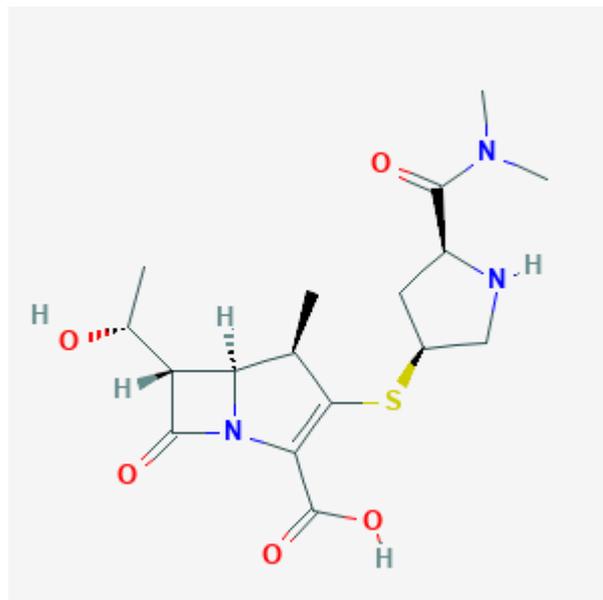


Abbildung 1: Struktur von Carbapenemen am Beispiel von Ertapenem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ertapenem#section=2D-Structure>, Erlaubnis nicht notwendig

Wie bereits erwähnt, umfasst das Wirkspektrum der Carbapeneme sowohl gram-negative als auch gram-positive Erreger. Außerdem sind sie wirksam gegen den gram-negativen Problemkeim *Pseudomonas aeruginosa* und in Kombination mit Clavulansäure wirksam gegen Mykobakterien. Es kann eine Einteilung der Carbapeneme in zwei Gruppen vorgenommen werden. Gruppe 1 umfasst Imipenem und Meropenem, zur Gruppe 2 zählt Ertapenem. Ertapenem ist nicht wirksam gegen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* (Sk2 Leitlinie 2018).

Die orale Bioverfügbarkeit von Carbapenemen ist gering, sie werden daher meist intravenös verabreicht. Die Ausscheidung erfolgt renal. Zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen zählen Nephro- und Neurotoxizität (Papp-Wallace et al. 2011). Außerdem sind Carbapeneme hepatotoxisch (Codjoe und Donkor 2017) und können dosisabhängig epileptogen wirken (Sk2 Leitlinie 2018). Kreuzallergien mit Penicillinen wurden nicht beobachtet (Cunha et al. 2008).

1.1.2.2 Resistenzen gegen Carbapeneme - Mechanismen und Vorkommen

Resistenzen gegenüber Carbapenemen wurden bereits früh nach deren Entdeckung beobachtet und betreffen überwiegend gram-negative Keime. Es lässt sich eine grobe Einteilung in intrinsische und erworbene Resistenzen vornehmen. Zuletzt konnte ein Auftreten intrinsischer Resistenzen in der Gruppe der Enterobakterien festgestellt werden (Codjoe und Donkor 2017). Auch *Stenotrophomonas maltophilia* und Methicillin-resistente Staphylokokken besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber Carbapenemen (Sánchez 2015, Sk2 Leitlinie 2018). Bezüglich der erworbenen Resistenzen können verschiedene Mechanismen unterschieden werden: enzymatische Inaktivierung, Mutation in der Zielstruktur des Antibiotikums und Pumpen, welche das Antibiotikum aus der Bakterienzelle schleusen. Der Großteil dieser Mechanismen ist plasmidkodiert und kann daher auf andere Bakterien übertragen werden (Codjoe und Donkor 2017). Entsteht eine Resistenz gegen Carbapeneme in gram-positiven Bakterien, so handelt es sich in der Regel um eine Mutation in der Zielstruktur der Carbapeneme, den PBPs. In der Entstehung von Resistenzen gram-negativer Bakterien gegenüber Carbapenemen spielen vielfältigere Mechanismen eine Rolle. So wurden beispielsweise Mutationen in OprD, einem Membranprotein, durch welches Carbapeneme an ihren Wirkort gelangen, als Resistenzmechanismus beobachtet (Bonomo und Szabo 2006). Ein weiterer Mechanismus ist die Expression von Pumpen in der Bakterienmembran, welche die Carbapeneme aktiv aus der Bakterienzelle schleusen (Schweizer 2002). Tritt dieser Resistenzmechanismus auf, kommt es häufig zu einer Multiresistenz, da auch

Fluorchinolone, Penicilline, Cephalosporine und Aminoglykoside häufig Substrate dieser Pumpen sein können (Meletis et al. 2012).

Die wichtigste Rolle im Rahmen der enzymatischen Inaktivierung nehmen die Carbapenemase ein. Carbapenemase gehören zur Gruppe der Betalaktamase und bilden eine Enzymgruppe, welche in der Lage ist, neben Carbapenemen auch einige andere Betalaktamantibiotika zu hydrolysieren. Carbapenemase können nach der Amber Klassifikation in die Untergruppen A bis D eingeteilt werden (Queenan und Bush 2007). Die ersten Carbapenemase wurden in den 1980er Jahren entdeckt. Das Vorkommen von Carbapenemase ist des Weiteren mit einer alarmierenden Mortalitätsrate von 18 bis 48%, je nach eingesetzter Therapie, verbunden (Nordmann et al. 2011).

Als Risikofaktoren für eine Infektion mit CRE wurden Krankenhausaufenthalte, kürzliche Stammzelltransplantation, mechanische Beatmung, Behandlung auf der Intensivstation sowie eine lange Aufenthaltsdauer im Krankenhaus identifiziert (Patel et al. 2008; Schwaber et al. 2008).

Pflegeeinrichtungen scheinen eine wichtige Rolle im Sinne eines Erregerreservoirs zu spielen (Perez et al. 2010). Die Prävalenz der CRE ist weltweit steigend. Sie betrug 2006 bis 2007 in den USA 4% bei Isolaten von *E. coli* und 10,8% bei *K. pneumoniae* (Hidron et al. 2008). Wie Abbildung 2 zeigt, sind die Zahlen in Europa bisher geringer. In Deutschland wird die Prävalenz von CRE 2013 mit 1,3 bis 1,6 % angegeben, ein Anstieg ist zu beobachten (Sk2 Leitlinie 2018).

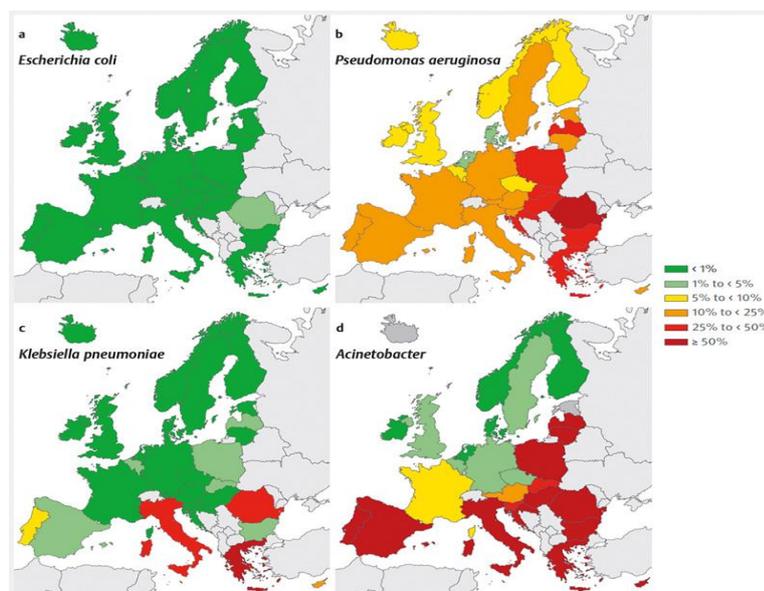


Abbildung 2: Häufigkeit der Carbapenem-Resistenz bei *E. coli* a, *Pseudomonas aeruginosa* b, *Klebsiella pneumoniae* c und *Acinetobacter* d in Staaten der EU. Daten zu invasiven Isolaten aus dem Jahr 2016, grau eingefärbte Bereiche entsprechen fehlenden oder zu wenigen Daten (European Centre for Disease Prevention and Control 2017). Mit freundlicher Erlaubnis des ECDC

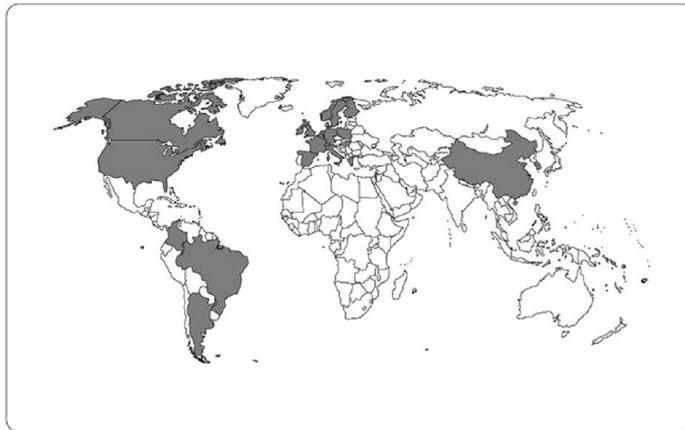


Abbildung 3: Internationale Ausbreitung KPC-produzierender *Enterobacteriaceae*, Stand Februar 2011. In den grau markierten Ländern wurden Fälle von KPC-produzierenden Enterobacteriaceae beschrieben. Aufgrund teilweise fehlender Daten ist ein Auftreten in einigen der nicht markierten Länder nicht ausgeschlossen (Gupta et al. 2011). Mit freundlicher Erlaubnis des CDC

Eine Infektion mit CRE kann schwerwiegende Krankheitsbilder, aber auch eine asymptomatische Besiedelung hervorrufen (Peleg et al. 2005). CRE konnten außerdem auch bei nicht hospitalisierten Personen und in der Tierindustrie nachgewiesen werden (Tzouvelekis et al. 2014). Besonders problematisch gestalten sich die Resistenzen, wenn sie plasmidkodiert sind und damit auf andere Bakterien übertragen werden können, was zu einer rascheren Ausbreitung führt (Gupta et al. 2011).

1.1.2.3 Klasse A-D Carbapenemasen

Der Gruppe der Klasse A Carbapenemasen ist gemein, dass sie Carbapeneme hydrolysieren und mittels Clavulansäure und Tazobactam inaktiviert werden können (Nordmann et al. 2011). Außerdem hydrolysieren Klasse A Carbapenemasen Penicilline, Cephalosporine und Aztreonam, was zu einer Multiresistenz der entsprechenden Bakterien führt (Ambler et al. 1991).

Sie sind teilweise chromosomal codiert (not metalloenzyme carbapenemase A, Imipenem-hydrolysing-lactamase), der Großteil der klinisch relevantesten Carbapenemasen wird allerdings auf einem übertragbarem Plasmid codiert (Nordmann et al. 2011). Als für die Klinik am relevantesten eingestuft werden die plasmidkodierten KPC-2 bis KPC-13, deren weltweite Ausbreitung in den letzten Jahren beobachtet werden konnte (Abb.3) (Nordmann et al. 2009). Der erste beschriebene Fall eines KPC-produzierenden Enterobakteriums, welches aus Patient*innenproben isoliert werden konnte, trat 2001 in den USA auf (Yigit et al. 2001). KPC wurde zuerst in *Klebsiella pneumoniae* entdeckt, konnte zuletzt allerdings auch in *Serratia marcescens* und *E. coli* nachgewiesen werden (Codjoe und Donkor 2017). Andere Klasse A Carbapenemasen

sind zum Beispiel SME, welches bisher nur in *Serratia marcescens* nachgewiesen werden konnte, IMI, nachgewiesen in verschiedenen Enterobakterien-Spezies, sowie GES, welches ebenfalls in verschiedenen *Enterobacteriaceae* auftritt. GES-2, -11 und -14 wurden bisher jedoch nur in *Pseudomonas* und *Acinetobacter* dokumentiert (Nordmann et al. 2012).

Auch die Gruppe der Klasse B Carbapenemasen hydrolysiert Carbapeneme, Penicilline und Cephalosporine, wird allerdings durch EDTA und damit nicht durch die herkömmlichen Betalaktamaseinhibitoren inaktiviert (Nordmann et al. 2012). Zu dieser Gruppe zählen die New Delhi metallo-lactamase 1 (NDM-1), Verona integron-encoded metallo-lactamase (VIM), German imipenemase (GIM) sowie die Seoul imipenemase (SIM). Diese Gruppe ist außerdem häufig auf Integrons codiert und kann daher im Sinne eines horizontalen Gentransfers von einem Bakterium auf andere Bakterien übertragen werden und sich so verbreiten (Queenan und Bush 2007). NDM wurde 2009 erstmals im Material eines schwedischen Patienten entdeckt, welcher zuvor in Indien behandelt worden war (Yong et al. 2009). Bis heute hat eine weltweite Ausbreitung von NDM, ausgenommen Südamerika und der Antarktis, stattgefunden (Johnson und Woodford 2013). NDM tritt überwiegend in *Klebsiella* auf, konnte zuletzt aber auch in *E.coli* und *Acinetobacter baumannii* dokumentiert werden (Nordmann et al. 2012; Gupta et al. 2011). VIM wurde bisher vor allem in *Pseudomonas* und weniger in Enterobakterien nachgewiesen. GIM, SIM, Dutch Imipenemase und Adelaide Imipenemase wurden bisher nicht in *Enterobacteriaceae* entdeckt (Nordmann et al. 2012).

Die Relevanz der Klasse C Carbapenemasen ist bisher nicht geklärt, sie besitzt allerdings eine hohe Effektivität gegen Carbapeneme (Jacoby und Munoz-Price 2005).

Die Gruppe der Klasse D Carbapenemasen wird weder durch Clavulansäure noch durch EDTA inhibiert. Sie zählen zur Gruppe der Oxacillinasen (OXA) und besitzen eine nur geringe Effektivität gegenüber Carbapenemen (Moquet et al. 2011). Breitspektrumcephalosporine werden von der Klasse D nicht hydrolysiert (Nordmann et al. 2012). Die von ihnen ausgehende Bedrohung für das Gesundheitssystem wird dennoch als hoch eingeschätzt, da sie häufig mutieren und dadurch ihr Resistenzspektrum regelmäßig erweitern können. Die am häufigsten beobachtete Unterform ist OXA-48 (Mathers et al. 2013). Das Auftreten wird bisher überwiegend im Mittelmeerraum beschrieben (Nordmann et al. 2012) und betrifft überwiegend *Klebsiella pneumoniae*, konnte zuletzt aber auch in *Acinetobacter* nachgewiesen werden. Generell

treten OXA überwiegend bei Nonfermentern wie *Acinetobacter* und *Pseudomonas* auf, seltener bei *Enterobacteriaceae* (Codjoe und Donkor 2017).

1.1.2.4 Kreuzresistenzen bei CRE

Wie oben beschrieben, hydrolysieren die genannten Carbapenemasen nicht nur Carbapeneme, sondern auch andere Antibiotika. Hieraus ergeben sich Kreuzresistenzen, die die Behandlung von CRE weiter erschweren. Das Vorkommen von Klasse A Carbapenemasen führt neben der Resistenz gegenüber Carbapenemen zu einer Resistenz gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Aztreonam. Klasse B Carbapenemasen bedingen eine Kreuzresistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen (Nordmann et al. 2012). Liegt der Resistenz gegenüber Carbapenemen die Expression einer Effluxpumpe zu Grunde, kommt es häufig auch zu einer Resistenz gegenüber Fluorchinolonen, Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglykosiden (Meletis et al. 2012).

Dadurch können Penicilline, Cephalosporine, Aztreonam, Fluorchinolone und Aminoglykoside nicht als zuverlässige Alternativen in der Therapie von CRE eingesetzt werden. Darüber hinaus ist eine Resistenzentwicklung unter Therapie nicht auszuschließen (Lee et al. 2009).

Liegt eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen, Piperacillin, Cephalosporinen der 3. Generation und Carbapenemen vor, spricht man von einem 4MRGN, also einem gramnegativen Erreger, der gegen die vier am häufigsten zur Behandlung von gramnegativen, komplizierten Erregern eingesetzten Antibiotika, resistent ist. Diese entstehen meist aus einem 3MRGN durch das Erlangen einer Carbapenemase und sind mit einer hohen Mortalität assoziiert. In 17,3 % der Fälle lösen 4MRGN HWI aus, am häufigsten führen sie jedoch zu einer beatmungs-assoziierten Pneumonie (Fritzenwanker 2018).

1.1.2.5 Behandlungsstrategien Carbapenem-resistenter Erreger

Da Carbapeneme bereits als Reserveantibiotika gelten, sehen sich die behandelnden Personen beim Auftreten Carbapenem- und häufig multiresistenter Erreger vor große Herausforderungen gestellt.

Im Falle der gram-positiven Erreger stehen aktuell noch ausreichend alternative Antibiotika zur Verfügung, beispielsweise Daptomycin oder Glykopeptide. Da Carbapenemase-produzierende Erreger meist auch resistent gegenüber den meisten der anderen Betalaktamantibiotika sind, ist die Auswahl stark begrenzt. Aktuell liegen bezüglich der Therapie von CRE keine kontrollierten, randomisierten Studien vor. Man

muss daher auf Fallberichte, retrospektive Studien mit kleiner Fallzahl und in vitro Studien zurückgreifen (Paul et al. 2014).

Vor allem in der Vergangenheit auf Grund ihrer multiplen, teils schwerwiegenden Nebenwirkungen wenig genutzte Antibiotikagruppen wie Colistin und Tigecyclin wurden in letzter Zeit häufiger zur Behandlung eingesetzt. Zuletzt wurden schwerwiegende Nebenwirkungen beim Einsatz von Colistin aber seltener beobachtet (Sk2 Leitlinie 2018). In vitro erwiesen sich Colistin und Polymyxin B als am effektivsten zur Bekämpfung von CRE. Da es allerdings auch hier bereits zur Resistenzentwicklung gekommen ist und die Mortalität der an durch CRE verursachten Infektionen erkrankten Patient*innen unter Colistinmonotherapie bei 42,8% lag, kann keine generelle Therapieempfehlung erfolgen (Gales et al. 2011; Tzouveleki et al. 2014). Auch eine Resistenzentwicklung unter Therapie wurde häufig beobachtet (Lee et al. 2009). Darüber hinaus sind die Daten zur optimalen Dosierung von Colistin unvollständig (Petrosillo et al. 2013) und Nebenwirkungen wie Neuro- und vor allem Nephrotoxizität treten insbesondere bei höheren Dosen, die bei CRE oft notwendig sind, häufig auf (Akajagbor et al. 2013).

Eine Kombinationstherapie bestehend aus einem Carbapenem und einem Polymyxin erschien allerdings häufig vielversprechend (Hagihara et al. 2014).

Auch bezüglich Tigecyclin sind die in vitro Daten bezüglich des Einsatzes zur Behandlung von CRE vielversprechend, in vivo zeigten sich aber auch hier gehäuft Resistenzen und eine geringere Wirksamkeit (Sader et al. 2014). Eine Hochdosistherapie scheint der üblichen Dosierung von Tigecyclin überlegen zu sein (Fritzenwanker 2018). Als häufig wirksam erwies sich jedoch eine Kombinationstherapie bestehend aus Colistin und Tigecyclin (Sbrana et al. 2013). Auch Amikacin und Gentamicin wurden erfolgreich zur Behandlung Carbapenem-resistenter Erreger eingesetzt (Abbott et al. 2013). Vor allem zur Behandlung von durch CRE ausgelösten Harnwegsinfektionen scheinen Aminoglykoside geeignet zu sein. Die Kombinationstherapie aus einem Aminoglykosid und einem Carbapenem zeigte mit etwa 11% die geringste Mortalitätsrate (Tzouveleki et al. 2014).

Bezüglich Fosfomycin zeigte sich in verschiedenen kleineren Studien ein erfolgreicher Einsatz als Monotherapie für KPC-, NDM-1- und OXA-48-produzierende CRE (Tuon et al. 2013; Perry et al. 2011; Navarro-San Francisco et al. 2013). Fosfomycin ist vor allem bei Harnwegsinfektionen gut wirksam, allerdings kommt es auch hier zur Resistenzentwicklung (Karageorgopoulos et al. 2012).

Soll trotz vorliegender Carbapenem-Resistenz der Einsatz von Carbapenemen zur Therapie erfolgen, kann bei minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC) bis zu < 16 µg/ml eine verlängerte Hochdosis-Infusionstherapie über 3 Stunden versucht werden. Ausreichend klinische Daten, um die Effektivität dieses Therapieregimes zu belegen,

sind allerdings nicht vorhanden (Daikos und Markogiannakis 2011). Zuletzt zeigte sich darüber hinaus eine Mortalitätsrate von etwa 40% unter Carbapenem-Monotherapie, weshalb diese Behandlungsstrategie nicht allgemein zu empfehlen ist (Tzouveleki et al. 2014).

Da eine Kombinationstherapie, welche ein Carbapenem enthielt, einer Kombinationstherapie ohne Carbapenem überlegen ist (Qureshi et al. 2012), kann geschlossen werden, dass insgesamt eine Kombinationstherapie, welche ein Carbapenem und mindestens ein weiteres Antibiotikum enthält, am effektivsten wirkt (French et al. 2017, Sk2 Leitlinie 2018). Hier sei darauf verwiesen, dass sich auch eine Kombinationstherapie, welche aus zwei Carbapenemen bestand, in Fallberichten als effektiv erwiesen hat (Giamarellou et al. 2013). Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass insbesondere KPC die höchste Affinität zu Ertapenem besitzt und daher bei Anwesenheit von Ertapenem und einem weiteren Carbapenem primär Ertapenem inaktiviert wird und sich dadurch die Wirksamkeit des weiteren Carbapenems verbessern kann (Wiskirchen et al. 2013). Daher erscheinen auch Kombinationstherapien aus zwei Carbapenemen und einer weiteren Antibiotikaklasse vielversprechend (Zavascki et al. 2013). Außerdem sollte eine optimierte Dosisfindung erfolgen (Morrill et al. 2015).

Vorteile von Kombinationstherapien liegen in einer Verminderung von initialer Fehltherapie, synergistischen Effekten zwischen den eingesetzten Antibiotika und möglicherweise einer verminderten Resistenzentwicklung unter Kombinationstherapie. Nachteile sind das gehäufte Auftreten von *Clostridium difficile* Infektionen, ein erhöhtes Risiko für eine Besiedelung oder Infektion mit anderen resistenten Erregern sowie eine Potenzierung eventueller Nebenwirkungen, wie beispielsweise Nephrotoxizität, und erhöhte Kosten. Durch den erhöhten Selektionsdruck unter Kombinationstherapie kann es außerdem auch zu einer erhöhten Resistenzentwicklung kommen (Petrosillo et al. 2013). Dennoch wird bei Überwiegen der Vorteile nach heutigem Stand am ehesten eine Kombinationstherapie zur Behandlung von CRE empfohlen. Kombinationstherapien bestehend aus verschiedenen Antibiotika werden schon seit längerer Zeit erfolgreich in der Therapie bakterieller Infektionen eingesetzt, beispielsweise zur Behandlung der Tuberkulose. Dennoch werden aktuell nur wenig fixe Kombinationen in der Klinik genutzt. Ein Beispiel für eine häufig genutzte Kombinationstherapie bildet Cotrimoxazol (Tyers und Wright 2019).

Die Vergleichbarkeit der in Reviews behandelten Studien ist aufgrund teilweise verschiedener untersuchter Resistenzmechanismen (KPC, NDM, OXA etc.) nur teilweise gegeben und die Ergebnisse nur bedingt übertragbar. In Deutschland wird für die Therapie von schweren, durch CRE ausgelösten Infektionen eine Kombinationstherapie

empfohlen. Bei einer MIC für Carbapenem < 8mg/l sollte die Kombinationstherapie ein Carbapenem enthalten. Liegt die MIC über 8 mg/l, sollte die Kombination aus Colistin und Tigecyclin bevorzugt werden (Sk2 Leitlinie 2018).

In Bezug auf durch CRE verursachte Harnwegsinfektionen können nach aktueller Studienlage vor allem die folgenden Therapieregime empfohlen werden: Hochdosis Carbapenem, gegebenenfalls in Kombination mit Fosfomycin oder einem Aminoglykosid und alternativ zu Carbapenemen Colistin (Morrill et al. 2015). In Deutschland besteht der höchste Empfehlungsgrad für Colistin, gefolgt von Tigecyclin, ggf. in Kombination (Sk2 Leitlinie 2018). Während für Kombinationstherapien generell empfohlen wird, bei Vorliegen eines Antibiogramms die Therapie zu de-eskalieren und nach dem Antibiogramm anzupassen, gilt im Fall von CRE die Empfehlung einer definitiven Kombinationstherapie (Tängdén 2014).

Seit 2015 ist Ceftazidim-Avibactam als neuer Wirkstoff verfügbar, Resistenzen wurden allerdings auch hier bereits beobachtet (Livermore et al. 2015). Der neue Betalaktamaseinhibitor Avibactam ist wirksam gegen KPC und einige OXA-Carbapenemasen, die Therapie ist allerdings mit Übelkeit, Obstipation und dem Auftreten von Krampfanfällen vergesellschaftet und nicht wirksam gegen Metallobetalaktamasen wie NDM (Castanheira et al. 2014; Actavis plc. 2015). Eine weitere neue Kombination ist Ceftolozan/Tazobactam, welche eine gute Wirksamkeit gegen Enterobakterien erreicht. Auch die Wirksamkeit gegen Klasse A- und C-Carbapenemase-produzierende Bakterien konnte gezeigt werden (Fritzenwanker 2018). Beim Vorliegen eines 4MRGN können ebenfalls Colistin, Aminoglykoside, Tigecyclin und Fosfomycin eingesetzt werden (Fritzenwanker 2018).

Die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Stoffe, welche bisher wenig vielversprechend erscheint, wird neben der beschriebenen Kombinationstherapie dennoch als effektivste Maßnahme zur Kontrolle Carbapenem- und multiresistenter Erreger angesehen. Während in naher Zukunft nicht mit der Entwicklung neuer Antibiotika zu rechnen ist und es für den Fall neuer Antibiotika gilt, diese vor Resistenzentwicklung zu schützen, sollten Kombinationstherapien primär zur Bekämpfung von CRE eingesetzt werden (Raymond 2019).

1.1.2.6 Präventionsstrategien zur Vermeidung der Entstehung von Carbapenemresistenzen

Auf Grund der oben beschriebenen Problematik kommt der Prävention in Bezug auf CRE eine zentrale Rolle zu. Strategien, die generell zur Vorbeugung von Resistenzentstehung verwendet werden, finden auch in der Prävention von Carbapenemresistenzen Anwendung. Beispielsweise sollte der Einsatz von Antibiotika mit Bedacht erfolgen und auch der Gebrauch invasiver Maßnahmen, wie auch das Anlegen eines Urindauerkatheters, sollte auf das Nötigste beschränkt werden (Gould et al. 2010).

Einige Länder haben CRE bereits auf die Liste der meldepflichtigen Erkrankungen gesetzt (Schwaber et al. 2011). Als besonders problematisch in Bezug auf die Prävention gilt, dass nicht alle medizinischen Labore bisher zuverlässig dazu in der Lage sind, Carbapenemresistenzen und Resistenzmechanismen zu detektieren, da die MICs in der Testung in einem als sensibel geltenden Bereich verbleiben können (Anderson et al. 2007). Hinzu kommen häufig eine fehlende Kommunikation zwischen Labor und behandelnden Ärzt*innen oder ein fehlendes Bewusstsein für die dringliche Problematik der CRE (Center for Disease Control and Prevention 2009). Dadurch verzögert sich nicht nur die adäquate Behandlung der betroffenen Patient*innen, sondern es kann auch zu einer vermeidbaren Ausbreitung der resistenten Erreger kommen.

1.2 Zielsetzung

Ärzt*innen aller Fachrichtungen kämpfen mit steigenden Resistenzraten bei Krankheitserregern. Dieses Problem macht auch vor den HWI, welche zu den häufigsten Konsultationsgründen sowohl im ambulanten als auch im stationären Bereich gehören, nicht Halt. Behandlungsmöglichkeiten sind begrenzt und es wird immer schwieriger, Patient*innen adäquat zu therapieren. Fulminante, teils lebensbedrohliche Verläufe von durch multiresistente Erreger ausgelösten HWI sind möglich. Um dies zu verhindern, ist eine wirksame antibiotische Therapie notwendig. Die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen würde hier den effektivsten Weg darstellen, da hier noch keine Resistenzen entstehen konnten. Neue Substanzen kommen jedoch nur langsam auf den Markt und alternative Strategien müssen gefunden werden. Dieser Arbeit liegt daher die Idee zu Grunde, bereits in der Therapie von durch CRE verursachte HWI erfolgreich eingesetzte Antibiotika und Antibiotikakombinationen auf ihre Interaktion im Sinne eines Synergismus oder Antagonismus zu prüfen und so aus bereits gut erprobten Antibiotika neue, sichere Therapieregimes zu entwickeln. Ziel der Arbeit war es, jeweils ein Carbapenem mit 8 Vertretern einer anderen Antibiotikaklasse zur Abtötung sechs

Carbapenem-resistenter und drei Carbapenem-sensibler Bakterienstämme zu kombinieren. Zunächst sollten in Checkerboard-Assays synergistische Kombinationen detektiert werden und diese dann weiter in einem dynamischen Blasenmodell verifiziert werden. Die Checkerboard-Assays wurden in Kationen-adjustiertem Müller-Hinton Medium (CAMHB) und artifiziellm Urin (AU) durchgeführt. Loose et al. konnten zeigen, dass das Medium, in dem die Resistenzbestimmung durchgeführt wird, grundlegenden Einfluss auf die Ergebnisse haben kann (Loose et al. 2019a). Daher erfolgte die Testung in CAMB und artifiziellm Urin. Im Blasenmodell wurden die Kombinationen, welche sich als synergistisch erwiesen hatten, auf drei Carbapenem-resistente Stämme angewendet. Unsere Zielsetzung lautete, synergistische, Carbapenem-enthaltende Antibiotikakombinationen unterschiedlicher Wirkmechanismen zur Behandlung Carbapenem-resistenter uropathogener Bakterien zu detektieren und durch Anwendung dieser Kombinationen durch zügiges Abtöten der Erreger die Entwicklung neuer Resistenzen zu minimieren. Die Hypothese, dass die Kombination aus einem Carbapenem und einem weiteren Antibiotikum gegen CRE wirksam ist und die Resistenzbildung minimieren kann, soll mit dieser Arbeit geprüft werden.

Eine Nutzung dieser gefundenen Antibiotikakombinationen wäre zeitnah möglich, da die getesteten Antibiotika bereits klinisch getestet und zugelassen sind, Nebenwirkungen und Interaktionen größtenteils bekannt sind und auch das abgedeckte Erregerspektrum bereits erforscht wurde. Eine Kombination zweier synergistisch wirksamer Antibiotika könnte außerdem dazu führen, dass eine geringere Gesamtdosis der einzelnen Antibiotika nötig wäre und so möglicherweise auch Nebenwirkungen reduziert werden könnten. Ein weiterer Vorteil bietet sich in der Möglichkeit, zwei Wirkstoffe in einer einzelnen Tablette zu vereinen. Dies führt gerade bei Polypharmazie zu einer Reduktion der Tablettenzahl und könnte so die Patient*innenzufriedenheit und Compliance erhöhen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Bakterienstämme, selbst erstellt

Art	Name	Carbapenem-resistent	Resistenzgen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	
	IR3	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
	BAA 2469	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
	NRZ 14408	+	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>mcr-1</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	595	-	
	BAA 1705	+	<i>bla</i> _{KPC}
	BAA 2146	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
<i>Enterobacter cloacae</i>	CHD 57	-	
	BAA 2468	+	<i>bla</i> _{NDM-1}

2.1.2 Verwendete Antibiotika

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Antibiotika, selbst erstellt

Gruppe	Name	Wirkung	Wirkmechanismus	Elimination	Hersteller
Carbapeneme	Meropenem	bakterizid	Hemmung Zellwandsynthese	renal	TCI
	Ertapenem	bakterizid	Hemmung Zellwandsynthese	renal	Melford Glentham life sciences
Fluorchinolone	Levofloxacin	bakterizid	Gyrasehemmer	renal	Sanofi Aventis TCI
	Ciprofloxacin	bakterizid	Gyrasehemmer	renal	Sigma
Polymyxine	Colistin	bakterizid	Membranschädigung	renal	Sigma
Nitrofurane	Nitrofurantoin	bakterizid	unbekannt	renal	Cayman Chemicals
Rifamycine	Rifampicin	bakterizid	Hemmung Transkription	hepatisch	TCI Sigma
Glycylcycline	Tigecyclin	bakteriostatisch	Hemmung Proteinbiosynthese	renal, biliär	LKT
Aminoglykoside	Tobramycin	bakterizid	Hemmung Proteinbiosynthese	renal	Tocris
Epoxyd-Antibiotika	Fosfomycin	bakterizid	Hemmung Zellwandsynthese	renal	Sigma

2.1.3 Verwendete Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe, in alphabetischer Reihenfolge, selbst erstellt

Name	Hersteller
Ammonium Chlorid	Serva
Calcium Chloride 2H ₂ O	Serva
D-Glucose-6-Phosphat	ROTH
Dimethylsulfoxid	Serva, ROTH
Di-sodium oxalate	Merck KGaA
Dulbecco's PBS (1x)	Capricorn Scientific
Essigsäure 100%	Merck KGaA
Ethanol absolut	Fischer
Gelatin	Serva
Magnesium chloride	Serva
Müller Hinton Agar 2	Sigma Aldrich
Müller Hinton Broth 2	Sigma Aldrich
Potassium chloride	Serva
Potassium dihydrogenphosphate	Serva
Salzsäure 37 %	Sigma Aldrich
Schafblut, defibriniert, 100 ml	Thermo Scientific
Sodium chloride	Serva
Sodium hydroxide	Merck KGaA
Sodium sulphate anhydrous	VWR chemicals
Trisodium citrate dihydrate	Sigma Aldrich
Tryptone Soya Broth	Oxoid
Urea	Serva, Sigma

2.1.4 Verwendete Utensilien

Tabelle 8: Verwendete Utensilien mit Herstellerangabe, in alphabetischer Reihenfolge, selbst erstellt

Name	Hersteller
Abdeckplatte mit Kondensationsringen, PS, hohes Profil (9mm), steril	Greiner Bio-One
Disposable Transfer pipettes 5,5 ml	VWR
Impfeschlingen	Sarstedt
Inject 20 ml Einmalspritzen	Braun
MIC Deckel für Mikrotiterplatten	Dr. Brinkmann Floramed e.K.
MIC Einweginoculator und Schale	Dr. Brinkmann Floramed e.K.
Mikrotiterplatte 96 Well, PS, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One
Mueller Hinton II Agar Platten	BD BBL
Nalgene 1000/ 500 ml Rapid Flow Filter Unit	Thermo Scientific
Syringe-driven Filter Unit Fast Flow 33mm	Millex GP
Pipettenspitzen	Sarstedt
Platte, 10 cm Durchmesser	Sarstedt
PP-Röhrchen steril, 14 ml	Greiner Bio one
Reaktionsgefäße (15/50 ml), konischer Boden	Greiner Bio one
SaveSeal Reagiergefäße (1,5/2 ml)	Sarstedt
Sterile disposable serological pipettes 50, 25, 10, 5 ml	Thermo Scientific
Wägebapier MN226 90 x 115 mm	Machery Nagel
UVetten	Eppendorf

2.1.5 Verwendete Geräte, in alphabetischer Reihenfolge

Tabelle 9: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe, selbst erstellt

Gerät	Hersteller und Modellname
Brutschrank	VWR – Incu Line
Bunsenbrenner	WLD TEC – Fuego basic
Magnetrührer mit Heizplatte	Rotilabo- MH15 LLG
Peristaltikpumpen	Ismatec- REGLO Digital MS-4/8
ph-Meter	Hanna Instruments- HI 2210
Pipette	Integra- Pipetboy 2
Schüttler	IKA- KS 4000 i control
Spektrophotometer	Thermo Scientific- Multiscan Go
Sterilwerkbank	Thermo Scientific- Safe 2020
Tischautoklav	Systemec – DE23
Vortexer	Scientific industries- Vortex Genie 2
Waage	Scout- Ohaus
Zentrifuge	Hereaus – Pico 21

2.1.6 Verwendete Lösungen

Artifizieller Urin

Tabelle 10: Rezept für artifiziellen Urin, adaptiert nach Stickler et al. 1999

	mM	Menge für Lösung in 1 Liter Wasser in mg
Calciumchloriddihydrat	3,3	490
Magnesiumchloridhexahydrat	3,2	650
Natriumchlorid	78,7	4600
Natriumsulfat	16,2	2300
Trisodiumcitratdihydrat	2,2	650
Kaliumdihydrogenphosphat	20,5	2800
Disodiumoxalat	0,15	20
Kaliumchlorid	21,5	1600
Ammoniumchlorid	18,7	1000
Urea	416,25	25000
Gelatine		5000

Nach Herstellung der Salzlösung wurde der pH auf 6,1 eingestellt und anschließend im Verhältnis 2:1 mit TSB-Medium vermischt.

CAMHB

11 g Müller-Hinton-Broth, gelöst in 500 ml Wasser. Vor der Verwendung wurde das Medium autoklaviert.

Tryptone Soya Broth

30 g des Mediums wurden in 1000 ml Wasser gelöst und vor der Verwendung autoklaviert.

Blutagarplatten und Agarplatten

Für 280 ml Agar wurden 8,8 g CAMHB-Agar II in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Bei ca. 60° Celsius wurden dem Agar 5 % Schafblut zugesetzt (entspricht hier 14 ml). Der entstandene Blutagar wurde gleichmäßig auf 7 rechteckige Platten verteilt (je circa 40 ml). Die Blutagarplatten wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank

aufbewahrt. Für die Platten ohne Schafblut wurde ebenso verfahren, das Zusetzen des Blutes entfällt.

Antibiotika-enthaltende Agarplatten

-Levofloxacin

Zur Herstellung der Levofloxacinstocklösung wurden 400 mg Levofloxacin in 4 ml Wasser mit 5 % Essigsäure gelöst. Die Sensibilität der Bakterien sollte später bei zwei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen getestet werden. Für eine Endkonzentration von 256 µg/ml wurden 768 µl der Stocklösung in je 300 ml Agar gegeben, für 1024 µg/ml 3,072 ml. Pro 10cm-Platte wurden 10 bis 15 ml der Levofloxacin-Agar-Mischung auf die Platte gegeben, welche nach dem Trocknen im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

-Rifampicin

200 mg Rifampicin wurden in 2 ml Dimethylsulfoxid aufgelöst. Für 64 µg/ml Rifampicin-Konzentration wurden aus dieser Lösung 0,192 ml in 300 ml Agar gegeben, für 256 µg/ml 0,768 ml. Die Rifampicin-Agar-Mischung wurde gleichmäßig auf die Platten verteilt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

-Fosfomycin

Um eine Konzentration von 100 mg/ml zu erreichen, wurden 800 mg Fosfomycin in 8 ml Wasser mit 5 % Salzsäure gelöst. Für eine Fosfomycin-Konzentration von 512 µg/ml wurden 1,536 ml der Fosfomycinlösung in 300 ml Agar gegeben, für eine Konzentration von 2048 µg/ml 6,144 ml. Die Mischung wurde gleichmäßig auf Platten verteilt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

-Ertapenem

Um eine Konzentration von 50 mg/ml zu erreichen, wurden 200 mg Ertapenem in 4 ml Wasser gelöst. Für eine Ertapenem-Konzentration von 128 µg/ml wurden 768 µl der Ertapenemlösung in 300 ml Agar gegeben, für eine Konzentration von 512 µg/ml 3,072 ml. Die Mischung wurde gleichmäßig auf Platten verteilt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung MIC & MBC

Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) sowie die minimale bakterizide Konzentration (MBC) wurden für jedes der in Tabelle 6 aufgeführten Antibiotika in Anwendung auf alle in Tabelle 5 aufgelisteten Bakterienstämme bestimmt. Jeder der Ansätze wurde sowohl in Cation-adjusted-Müller-Hinton-Broth (CAMHB) als auch in artifiziellem Urin (AU) durchgeführt. Außerdem wurden Bakterienkonzentrationen von 10^5 und 10^6 CFU/ml sowie ein pH des AU von 7,2 und 8,2 getestet (Clinical and Laboratory Standards Institute 2015).

Hierzu mussten zunächst die Antibiotika nach Herstellerangaben gelöst und Stocklösungen hergestellt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Lösungsmittel und Zielkonzentration der verwendeten Antibiotika, selbst erstellt

Lösungsmittel	Im Lösungsmittel lösende Antibiotika	zu Konzentration des Antibiotikums [mg/ml]	
Wasser	Colistin sulfat	10	
	Ertapenem	10	
	Tobramycin	10	
	Amikacin	10	
Dimethylsulfoxid	Tigecyclin	10	
	Rifampicin	10	
	Nitrofurantoin	10	
	Meropenem	10	
Salzsäure (HCl)			
	0,1 M	Ciprofloxacin	10
	1,0 M	Fosfomycin sodium	50
Essigsäure (100%)	Levofloxacin	10	

In einem ersten Schritt erfolgte das Vorlegen von Medium (CAMHB oder AU) in einer 96-Well-Platte. In die erste Spalte wurden 280 µl, in die übrigen Spalten 140 µl des Mediums gegeben. Anschließend wurde in die erste Spalte jeweils die höchste zu testende Antibiotikakonzentration gegeben. Diese lag bei allen Antibiotika, außer bei Fosfomycin, bei 64 µg/ml. Um dies zu erreichen, wurden 1,8 µl der Stocklösung [10 mg/ml] in 280 µl Medium gegeben. Für Fosfomycin, dessen Ausgangskonzentration bei 50 mg/ml lag, lag die höchste zu testende Konzentration bei 1024 µg/ml; daher wurden hier 5,7 µl der Stocklösung zum Medium zugegeben. Außerdem wurde bei der Bestimmung der MIC/MBC von Fosfomycin Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration 25 µg/ml) in das Medium gegeben, da Fosfomycin Glucose-6-Phosphat benötigt, um die bakterielle Zellwand zu penetrieren (Souli et al. 2011). Es folgte nun eine Zweifach-Serienverdünnung von Spalte zu Spalte, bis hin zur vorletzten Spalte. Die überschüssigen 140µl aus der vorletzten Spalte wurden verworfen. Die letzte Spalte

wurde zur Durchführung einer Negativ- und Positivkontrolle verwendet, hier wurde kein Antibiotikum zugegeben. Damit betrug das Endvolumen in den Wells der 96-Well-Platte jeweils 140 µl. Die Versuche mit AU wurden außerdem auch vergleichend bei einem pH-Wert des AU von 7,2 und 8,2 durchgeführt.

Am Nachmittag zuvor war eine Übernachtskultur der zu testenden Bakterienstämme angesetzt worden. Hierzu wurden von einer mit Glycerinkulturen der zu testenden Bakterienstämme beimpften und inkubierten Agarplatte mit Hilfe einer Einmal-Impföse zwei bis drei Bakterienkolonien in 5 ml TSB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttler inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am Folgetag 1:100 in frischem TSB-Medium verdünnt und nochmals für etwa anderthalb Stunden in einem Schüttler (37°C, 180rpm) inkubiert. Nach Ablauf dieser anderthalb Stunden erfolgte eine Messung der Optischen Dichte (OD) von 150µl der verdünnten Übernachtskultur bei einer Wellenlänge von 600nm.

Mittels der gemessenen OD₆₀₀ konnte anhand von Wachstumskurven die CFU/ml an Bakterien in der Kultur bestimmt werden. Hierfür wurden folgende Formeln verwendet:

$$4800000000 * OD_{600}^2 + 4800000000 * OD_{600} - 4800000$$

für alle Stämme der Art *E. coli* und *K. pneumoniae*

Formel 1

$$20000000000 * OD_{600}^2 - 3000000000 * OD_{600} - 30000000$$

für alle Stämme der Art *E. cloacae*

Formel 2

Mit Hilfe der so errechneten Bakterienkonzentrationen der Kulturen konnte die Menge berechnet werden, welche benötigt wurde, um Lösungen mit einer Bakterienkonzentration von $7,5 * 10^5$ beziehungsweise $7,5 * 10^6$ CFU/ml zu erstellen.

Aus diesen Lösungen wurden je 10 µl in jedes Well der zuvor vorbereiteten 96-Well-Platte gegeben. In der letzten Spalte wurden nur in die ersten vier Wells Bakterien zugegeben (Positivkontrolle), die übrigen vier Wells blieben leer (Negativkontrolle). Die 96-Well-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Überprüfung des Inokulums wurde eine 10^{-4} (im Falle einer Bakterienkonzentration von 10^5 CFU/ml) beziehungsweise 10^{-5} (im Falle einer Bakterienkonzentration von 10^6 CFU/ml) Verdünnung der in die 96-Well-Platten gegebenen Bakterienlösung in PBS erstellt. Von dieser wurden je 50 µl auf MHB-Agarplatten ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte dann die Auszählung der Inokulum-

Platten, um zu überprüfen, ob die angestrebte Bakterienkonzentration erreicht worden war. Das Inokulum bewegte sich zwischen $3,4 - 8,5 \times 10^5$.

Die über Nacht inkubierten 96-Well-Platten wurden mit Hilfe eines Einmal-Inokulators auf zuvor hergestellte Blutagarplatten übertragen. Dies diente der Bestimmung des MBC-Wertes, da nach Übertragung auf die Blutagarplatte nur noch diejenigen Bakterien wachsen konnten, die zuvor die Behandlung mit dem Antibiotikum überlebt hatten. Die Blutagarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Übertragen auf Blutagarplatten erfolgte eine OD-Messung der 96-Well-Platten bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei der Auswertung der Messwerte wurde ein Wert $\geq 0,1$ als Bakterienwachstum gewertet. Zuvor wurde der Leerwert, bestimmt durch Messung der Negativkontrolle, abgezogen. Schließlich wurde die geringste Antibiotikakonzentration, bei der kein sichtbares Wachstum mehr erfolgte (OD-Werte $< 0,1$), als **minimale inhibitorische Konzentration** festgehalten.

Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration wurden am Folgetag die Blutagarplatten ausgewertet (Barry 1999). Hier wurde die geringste Antibiotikakonzentration, bei der nur noch sechs oder weniger Kolonien auf der Blutagarplatte gewachsen waren, als **minimale bakterizide Konzentration** festgehalten, dies entspricht einem Abtöten von 99,9% des Bakterieninokulums.

Die beschriebenen Versuche wurden für jede Bakterienart in Kombination mit jedem der verwendeten Antibiotika in jedem der Medien (CAMHB und AU, pH 7,2 und 8,2) wenigstens drei Mal durchgeführt.

2.2.2 Kombinationstestung zur Detektion synergistisch wirkender Antibiotika, Checkerboard-Assays

Jedes der in Tabelle 6 gelisteten Antibiotika wurde zunächst in Kombination mit Meropenem als Vertreter der Gruppe der Carbapeneme und später in Kombination mit Ertapenem getestet, um synergistische Kombinationen zu finden. Die zu testenden Antibiotikakonzentrationen orientierten sich hierbei an den für die einzelnen Bakterienstämme gefundenen MIC-Werte.

Diese Checkerboard-Assays wurden orientierend an Eliopoulos GM und Moellering, JR. 1996 und EUCAST 2000 durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst in Reaktionsgefäßen eine 10fach höhere Antibiotikakonzentration im zu testenden Medium (CAMHB und artifizieller Urin) angesetzt, als später als maximale Konzentration in der 96-Well-Platte untersucht werden sollte, also beispielsweise für eine höchste zu testende Konzentration von 64

µg/ml 640µg Antibiotikum in 1 ml Medium. Anschließend erfolgte eine 2-fach Serienverdünnung in weiteren Reaktionsgefäßen. Nun wurden je 15 µl dieser Lösungen in die entsprechenden Wells der 96-Well-Platte gegeben. In einem Endvolumen von 150µl ergab sich dadurch eine 1:10 Verdünnung der Antibiotikakonzentration. Das erste Antibiotikum wurde entlang der Spalten, das zweite Antibiotikum entlang der Zeilen aufgetragen (Abb. 4). Es wurde in einem ersten Durchlauf immer Meropenem gegen eines der anderen in Tabelle 6 gelisteten Antibiotika getestet. In einem zweiten Durchlauf erfolgte dann die Testung mit Ertapenem als Kombinationspartner für die anderen Antibiotika. War Fosfomycin einer der Kombinationspartner, wurde Glucose-6-Phosphat in einer Konzentration von 25 µg/ml hinzugegeben. Zu den Wells, in denen jeweils nur ein einzelnes Antibiotikum getestet wurde, wurden 15 µl Medium zugegeben. In die Wells für die Positivkontrolle wurden 30 µl Medium vorgelegt.

Zur Vorbereitung der Bakterien war am Vortag eine Übernachtskultur (siehe 2.2.1) angesetzt worden. Diese wurde 1:100 in frischem TSB-Medium verdünnt und für zwei Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde von 150 µl der Bakterienkultur eine OD-Messung bei 600 nm im Plattenphotometer durchgeführt. Anhand der Wachstumskurven (siehe 2.2.1) wurde die Bakterienanzahl in den Kulturen bestimmt und entsprechend eine Bakterienlösung mit einer Konzentration von $1,25 \cdot 10^6$ CFU/ml hergestellt. Pro Platte wurden 13 ml benötigt. Die benötigte Menge der Bakterienausgangslösung wurde wie folgt berechnet:

$$X \text{ CFU/ml} / 1,25 \cdot 10^6 \text{ CFU/ml} \cdot 13 \text{ ml} = \text{ml der Bakterienausgangslösung}$$

Formel 3

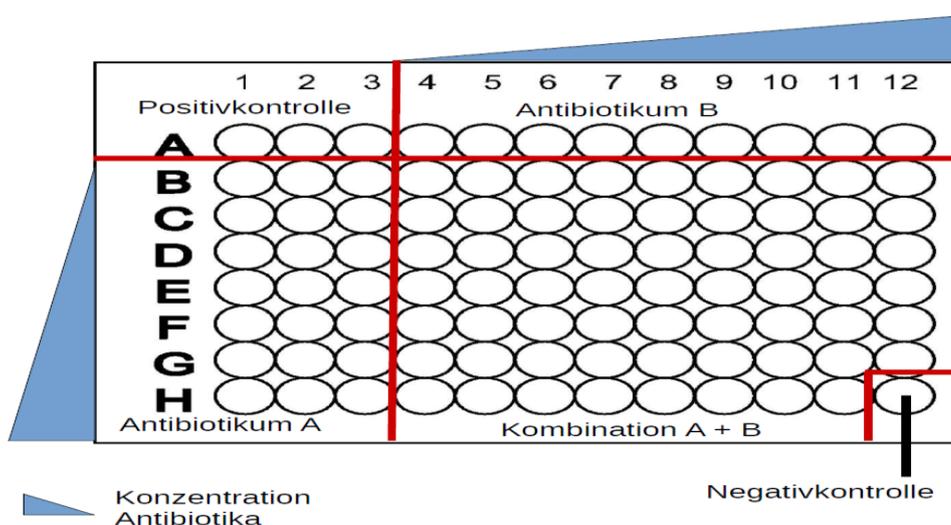


Abbildung 4: Schema Checkerboard. Adaptiert nach <http://madinbelgrade.com/96-well-plate-template.html/96-well-plate-templatetrxsuspensiontraining-within-96-well-plate-intended-for-96-well-plate-template>

Aus dieser fertigen Lösung wurden 120 µl in alle Wells der vorbereiteten 96-Well-Platte gegeben. In die Negativkontrolle wurde keine Bakterienlösung gegeben. So wurde schließlich eine Endkonzentration von $1 \cdot 10^6$ CFU/ml im Well erreicht. Die 96-Well-Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Überprüfung des Inokulums wurde eine 10^{-3} -Verdünnung der Bakterienlösung in PBS hergestellt und davon wurden 50 µl auf MHB-Platten ausplattiert. Diese wurden ebenfalls bei 37 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag wurden die Kolonien ausgezählt, um zu prüfen, ob die angestrebte Bakterienmenge erreicht worden war. Das Inokulum bewegte sich zwischen $3,1-9,5 \times 10^5$ CFU/ml.

Am Folgetag wurden für die Bestimmung der MBC-Werte etwa 3 µl aus jedem Well der 96-Well-Platten mit Hilfe eines Einmal-Inokulators auf Blutagarplatten übertragen und diese erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde die Absorption der 96-Well-Platten bei 600 nm im Plattenphotometer gemessen.

Die Versuche wurden in CAMHB und AU für die Antibiotikakombinationen jeweils ein bis zwei Mal durchgeführt.

Zur Bewertung der Wirksamkeit der Antibiotika in Kombination miteinander wurden anschließend die FIC (fractional inhibitory concentration)-Werte berechnet. Dies erfolgte nach Formel 4.

$$\Sigma \text{FIC} = \text{FIC}_{\text{Antibiotikum A}} + \text{FIC}_{\text{Antibiotikum B}}$$

$$\text{FIC}_{\text{Antibiotikum A}} = \frac{\text{MIC}_{\text{Antibiotikum A in Kombination}}}{\text{MIC}_{\text{Antibiotikum A allein}}}$$

$$\text{FIC}_{\text{Antibiotikum B}} = \frac{\text{MIC}_{\text{Antibiotikum B in Kombination}}}{\text{MIC}_{\text{Antibiotikum B allein}}}$$

Formel 4 (Jenkins und Schuetz 2012)

Antibiotikakombinationen mit FIC-Werten $\leq 0,5$ wurden als synergistisch wirksam erachtet, während Kombinationen mit FIC-Werten zwischen $>0,5$ und ≤ 1 als additiv wirksam und Kombinationen mit FIC-Werten >1 als antagonistisch wirksam betrachtet wurden (EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000 2000).

2.2.3 Simulation physiologischer Verhältnisse in einem dynamischen Blasen-Modell

Die synergistisch und additiv wirksamen Antibiotikakombinationen, die in 2.2.2 gefunden worden waren, sollten anschließend im dynamischen Blasen-Modell getestet werden. Das Blasen-Modell wurde adaptiert nach Dalhoff et al. 2017 und Abbott et al. 2018.

Das Blasen-Modell bestand aus einem Gefäß, das mit frischem artifiziellem Urin gefüllt war und damit die Urin produzierenden Nieren darstellte. Daran angeschlossen war ein Gefäß, in welchem sich artifizierlicher Urin mit zugesetztem Antibiotikum befand, als simulierter Sekundärharn Teil des Modells. Im Falle der Kombinationstestung zweier

Antibiotika wurden zwei „Sekundärharn“-Gefäße mit je einem Antibiotikum verwendet. Dritter Bestandteil des Modells war eine simulierte Harnblase, in die je einer der zu testenden Bakterienstämme gegeben worden war. Im Versuchsaufbau war es möglich, parallel 2 Blasen zu simulieren. So konnten in einem Versuchsaufbau zeitgleich zwei Bakterienstämme untersucht werden. Diese Blasen wurden zur Simulation der Miktion alle drei Stunden entleert (Abb. 5-6) Die Blasen standen in einem Wasserbad bei 37°C, entsprechend der menschlichen Körpertemperatur.

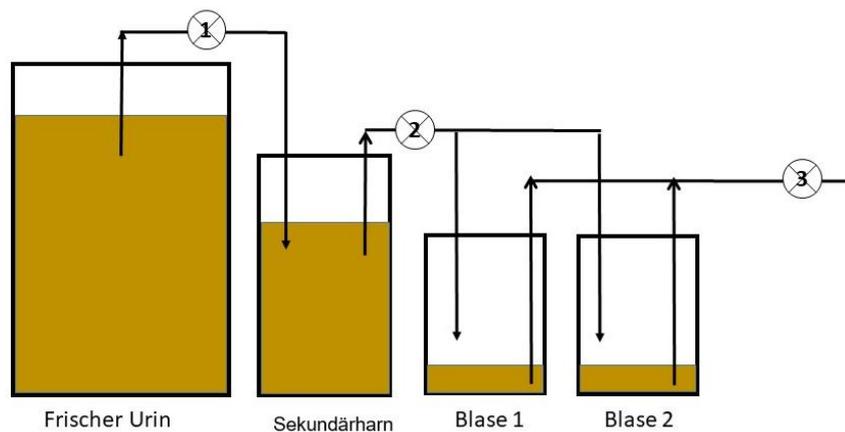


Abbildung 5: Versuchsaufbau mit einem Antibiotikum. Selbst erstellt.

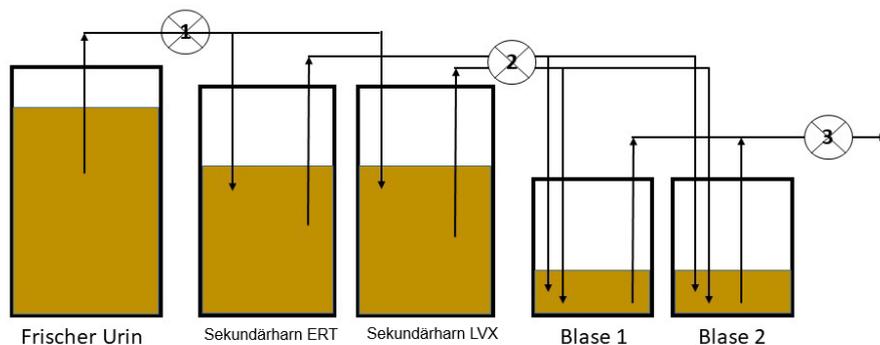


Abbildung 6: Versuchsaufbau Blasenmodell mit zwei Antibiotika, hier Ertapenem (ERT) und Levofloxacin (LVX). Selbst erstellt.

Die Blasen-simulierenden Gefäße wurden unter Annahme einer physiologischen Urinproduktion von 1,5 l in 24 Stunden (entspricht ca. 1 ml/min, entspricht wiederum 0,5 ml/min pro Blase) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min befüllt (Pumpe 2 in Abb.5) und alle drei Stunden (entsprechend einem physiologischen Miktionsintervall) wurden über Pumpe 3 im Rahmen der simulierten Miktion 90 Milliliter entleert. Ein Restharn von 9 ml verblieb in den Blasen. Das Volumen im „Sekundärharn“ blieb über den gesamten

Beobachtungszeitraum durch eine stetige Auffüllung aus dem Urinreservoir mit einer Flussrate von 1 ml/min konstant (Pumpe 1 in Abb.5).

Tabelle 12: Daten zur Berechnung der Antibiotikamenge, die zu Versuchsbeginn in den "Sekundärharn" des Blasen-Modells gegeben werden musste, selbst erstellt

	Dosis	Halbwertszeit	Eliminationskonstante k_E	Recovery im Urin	Quellen
Ertapenem	1000 mg 1 x täglich intravenös	4,8 h	0,145 h ⁻¹	49,7 %	(Musson et al. 2004; Zhou et al. 2014)
Levofloxacin	500 mg 1 x täglich intravenös	6,7 h	0,104 h ⁻¹	77,8 %	(Chien et al. 1997; Wagenlehner et al. 2006)
Fosfomycin	3000 mg 1 x oral	4,5 h	0,154 h ⁻¹	39 %	(Acocella und Scotti 1976)
Rifampicin	600 mg 1 x täglich oral	3 h	0,231 h ⁻¹	15 %	(Bergan et al. 1993; Bergan 1990)

Vor Beginn des Versuchs musste die benötigte Menge „Sekundärharn“ sowie die darin zu lösende Menge Antibiotikum berechnet werden. Es wurde die Pharmakokinetik nachfolgend der in der Klinik üblichen Dosierung der verwendeten Antibiotika simuliert (Tabelle 12). Anhand der bekannten Eliminationskonstanten (Tabelle 12) konnte mittels der folgenden Formel das benötigte Volumen an „Sekundärharn“ bei einer Fließgeschwindigkeit von 60 ml/ h berechnet werden:

$$k_E = F/V, \text{ also } V = F/k_E$$

V- Volumen, F- Fließgeschwindigkeit der Pumpe 1

Formel 5

Die zugegebene Menge Antibiotikum entsprach der in der Klinik üblichen Dosis und wurde entsprechend der Recoveryrate im Urin angepasst (Tabelle 13).

Tabelle 13: Die benötigte Sekundärharmenge in Millilitern sowie die Menge an zugesetztem Antibiotikum, berechnet nach oben stehender Formel, selbst erstellt

	Benötigte Sekundärharmenge in ml	Zugegebene Menge Antibiotikum in mg
Ertapenem	413,79	497
Levofloxacin	576,92	389
Rifampicin	259,74	90
Fosfomycin	389,6	1170

Die zu erwartenden Antibiotika-Konzentrationen in der Blase wurden entsprechend der normalen Pharmakokinetik-Parameter (Tabelle 12) nach Verabreichung einer Einzeldosis bei einer angenommenen Urinproduktionsrate von 1,5 L/ 24 h berechnet. Hierzu wurde zunächst die kumulative Menge des Antibiotikums in mg ($X_{U(t)}$) im Urin berechnet:

$$X_{U(t)} = a * (1 - e^{(-k_E * t)}) / 2$$

a- zugegebene Menge Antibiotikum in mg

k_E - Eliminationskonstante

Formel 6

Anschließend wurde die Konzentration des Antibiotikums in mg/ml ($C_{U(t)}$) zu einem bestimmten Zeitpunkt errechnet:

$$C_{U(t)} = X_{U(t)} / (V_R + V_B)$$

V_R – Volumen Restharn

V_B - eingepumptes Volumen in der Blase zum Zeitpunkt t

Formel 7

Da alle 3 Stunden jeweils die Blase entleert wurde, muss nach jeweils 3 Stunden die abgeführte Menge an Antibiotikum abgezogen werden. Dabei summierte sich die abgezogene Menge alle 3 Stunden.

$$C_{U(t>3)} = X_{U(>3)} - (C_{U(3)} * V_L) / (V_R + V_B)$$

$$C_{U(t>6)} = X_{U(>6)} - ((C_{U(3)} + C_{U(6)}) * V_L) / (V_R + V_B)$$

$$C_{U(t>9)} = X_{U(>9)} - ((C_{U(3)} + C_{U(6)} + C_{U(9)}) * V_L) / (V_R + V_B) \text{ usw...}$$

V_L - Volumen der Blasenentleerung

Formel 8

Zur „Infektion“ der Blasen-simulierenden GefäÙe wurde eine Übernachtskultur des zu testenden Bakterienstamms (ca. 1×10^9 CFU/ml) 1:10 verdünnt, indem 900 µl PBS mit 100 µl der Übernachtskultur gemischt wurden. 90 µl dieser Mischung wurden zu den 9 ml in den „Blasen“ vorgelegtem „Restharn“ gegeben, um eine CFU von 1×10^6 /ml zu erreichen.

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration über die Zeit wurde aus den Blasen-simulierenden GefäÙen nach 0/ 0,5/ 1/ 2/ 4/ 6/ 24 und 48 Stunden eine Probe entnommen. Die entnommene Probe wurde je nach erwartetem Bakterienwachstum 10^{-1} bis 10^{-6} verdünnt, um nach dem Ausplattieren auf eine Agarplatte ein Auszählen zu ermöglichen. Nach dem Ausplattieren wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am Folgetag ausgezählt. So konnte die Bakterienanzahl bestimmt werden.

Gleichzeitig wurde zur Prüfung des Inokulums 50 µl einer 10^{-5} -Verdünnung vom Zeitpunkt 0 entnommen und ausplattiert, bei 37°C über Nacht inkubiert und am Folgetag ausgezählt.

Zur Prüfung der Bakteriensensibilität auf die getesteten Antibiotika und Prüfung sich eventuell entwickelnder Resistenzen wurde zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 h eine Probe aus den Blasen-simulierenden GefäÙen entnommen. Diese Probe wurde zur Gewinnung der Bakterien abzentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 100 µl Medium aufgenommen. Diese wurden weiter in einer 10^{-1} - und 10^{-3} -Verdünnung auf die zuvor hergestellten Antibiotika-enthaltenden Agarplatten ausplattiert. Pro Antibiotikum wurde zwei Konzentrationen (1xMIC & 4xMIC), getestet. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt.

2.2.4 Bestimmung der Antibiotikakonzentration

Zur Bestimmung der tatsächlich in den Blasen-simulierenden GefäÙen vorhandenen Antibiotikakonzentration über die Zeit wurden in den Versuchen mit je nur einem Antibiotikum zu allen Zeitpunkten eine Probe entnommen und 1:10 in Wasser verdünnt. Für jedes der im Blasen-Modell getesteten Antibiotika wurde zunächst eine Standardreihe zur Referenz erstellt. Hierzu wurde eine definierte Menge des Antibiotikums in einer 10:1 Mischung aus Wasser und AU gelöst. Die gelöste Menge reichte von 0 bis 100 µg/ml des Antibiotikums. Die Absorption der Standardreihen und der Proben aus den Blasen-simulierenden GefäÙen wurde dann je bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximum des jeweiligen Antibiotikums gemessen. Dies waren 296 nm für Ertapenem, 298 nm für Levofloxacin und 472 nm für Rifampicin. Für die Bestimmung der Fosfomycinkonzentration wurde ein Verfahren auf Basis der Bildung eines 1:1-Ladungsübertragungskomplexes mit Alizarin in Ethanollösung verwendet (Liu YM et al.

2010). Die Proben aus der Blase wurden in Ethanol verdünnt und mit 5 mM Alizarin vermischt. Anschließend wurde die Absorption bei 545 nm (Absorptionsmaximum) gemessen. Die Versuche zur Konzentrationsbestimmung von Fosfomycin wurden von Maria Loose in Ergänzung zur Veröffentlichung von (Loose et al. 2019b) durchgeführt. Mittels der erstellten Standardreihen konnten die tatsächlichen Konzentrationen in den untersuchten Proben aus den Blasen-simulierten Gefäßen berechnet werden. Aus der gemessenen Standardreihe wurde eine Trendlinie erstellt. Mittels der so erhaltenen Formel konnte man die Konzentrationen in den Proben zur Konzentrationsbestimmung aufgrund der gemessenen Absorption zurückrechnen. Es wurden zur Bestimmung der Antibiotikakonzentration zu vier Zeitpunkten Messungen durchgeführt. Dies wurde im Versuchsaufbau mit einem Antibiotikum und für jeden der vier Bakterienstämme durchgeführt. Aus diesen Messungen wurden zur Bestimmung der Antibiotikakonzentration Mittelwerte mit Standardabweichung gebildet.

Die angestrebte Dosierung im Modell entsprach den in der Klinik üblichen Dosierungen. Die zu erwartende Menge des Antibiotikums konnte außerdem mathematisch errechnet werden. Die tatsächlichen, wie oben beschrieben, gemessenen Werte wurden anschließend mit den errechneten Werten verglichen.

Zunächst muss die kumulative Menge des Antibiotikums in mg ($X_{U(t)}$) in der Blase nach Formel 6 berechnet werden.

Anschließend kann die Konzentration des Antibiotikums in mg/ml ($C_{U(t)}$) zu einem bestimmten Zeitpunkt mittels Formel 7 errechnet werden

Da nach 3 Stunden jeweils die Blase entleert wird, muss nach jeweils 3 Stunden das abgepumpte Volumen abgezogen werden. Dabei summiert sich die abgezogene Menge alle 3 Stunden (siehe Formel 8).

Für alle Antibiotika wurde so verfahren und es konnte so eine „Soll“-Kurve für den Verlauf der Antibiotikakonzentration erstellt werden. Die gemessene Konzentration wurde dann mit dieser verglichen.

2.2.5 Statistische Analysen

Alle Berechnungen wurden mittels Microsoft Excel 2016 durchgeführt. Für die Berechnung der MIC-/MBC-Werte wurde der Median aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen gebildet. Eine Streuung für die Ergebnisse des Bakterienwachstums im Blasen-Modell wurde nicht dargestellt, da diese Versuche nicht wiederholt wurden. Alle Werte wurden deskriptiv dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 MIC- und MBC-Bestimmung

Die Bestimmung der MIC und MBC für jedes der getesteten Antibiotika in Anwendung auf alle untersuchten Bakterienstämme bildete als erster Versuchsschritt die Grundlage für die Folgeversuche. Beide wurden mit einer Bakterienkonzentration von 10^5 und 10^6 CFU/ml, in einem pH von 7,2 und 8,2 sowie in CAMHB und AU bestimmt. Die Versuche wurden neben CAMHB auch in AU durchgeführt, da Loose et al. zeigen konnten, dass Tobramycin aufgrund des veränderten pH-Wertes in AU im Vergleich zu CAMHB in AU eine erniedrigte Aktivität besitzt (Loose et al. 2018). Auch Dalhoff et al. konnten eine erniedrigte Aktivität von Fluorchinolonen in AU nachweisen (Dalhoff et al. 2011). Um eine bessere Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf die Situation in vivo zu ermöglichen, wurden daher die Versuche sowohl in CAMHB als auch in AU durchgeführt. Die Bestimmung der MBC erfolgte, um die bakterizide Aktivität der getesteten Antibiotika zu überprüfen. Die MBC ist die minimale Konzentration eines Antibiotikums, bei der noch 99,9 % aller Bakterien abgetötet werden. Sie liegt im Normalfall über der MIC, kann aber auch den gleichen Wert annehmen. Die drei Carbapenem-sensiblen Bakterienstämme, *E. coli* ATCC25922, *K. pneumoniae* 595 und *E. cloacae* CHD57 zeigten wie zu erwarten in der Bestimmung der MIC Werte, die laut Definition der EUCAST für eine Sensibilität gegenüber den verwendeten Antibiotika sprachen (Tabelle 14) (EUCAST 2000).

Tabelle 14: Median für die MIC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Dargestellt sind die Median-Werte von 2/3 Messungen. Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>K. pneumoniae</i> 595	<i>E. cloacae</i> CHD57
Amikacin	16 / 32	8 / 32	2 / 16
Ciprofloxacin	0,0625 / 0,09375	0,0625 / 0,125	0,0625 / 0,25
Colistin	1,5 / 3	2,5 / 1	2 / 1
Ertapenem	0,0625 / 0,03125	0,25 / 0,03125	0,125 / 0,03125
Fosfomycin	48 / 64	256 / 512	320 / 512
Levofloxacin	0,0625 / 0,25	0,0625 / 0,1875	0,0625 / 0,5
Meropenem	0,125 / 0,125	0,1875 / 0,3125	0,125 / 0,25
Nitrofurantoin	16 / 8	24 / 32	40/32
Rifampicin	16 / 16	16 / 16	24 / 32
Tigecyclin	0,625 / 1	0,25 / 1	1 / 2
Tobramycin	4 / 8	1,5 / 8	1 / 4

Allerdings lagen in der Literatur bezüglich Rifampicin keine Werte vor. Für die MBC sind in der Literatur nicht wie im Fall der MIC Referenzwerte für verschiedene Bakterien und Antibiotika vorhanden, ab denen von einer Resistenz gesprochen werden kann.

Die medianen MICs lagen für Meropenem im sensiblen Bereich, beispielsweise bei *K. pneumoniae* 595 in CAMHB bei 0,188 mg/l und im Fall von *E. coli* ATCC25922 bei 0,25 mg/l. Auch Fluorchinolone waren mit MIC-Werten zwischen 0,0625 und 0,5 mg/l im sensiblen Bereich (siehe Tabelle 14). Vergleicht man die Messungen in CAMHB und AU, zeigen sich im Falle der sensiblen Bakterienstämme nur wenige Unterschiede. Tobramycin und Tigecyclin waren in AU weniger wirksam. Am größten war die Wirkdifferenz im Fall von *K. pneumoniae* 595 mit einer MIC von 1,6 mg/l in CAMHB für Tobramycin und 0,25 mg/l für Tigecyclin und einer MIC von 8 mg/l für Tobramycin und 1 mg/l für Tigecyclin in AU. Amikacin war in AU ebenfalls weniger wirksam mit einer 8-fach höheren MIC in AU für *E. cloacae* CHD57 (16 mg/l). Meropenem besaß bei den sensiblen Bakterienstämmen in AU und CAMHB eine vergleichbare Wirksamkeit. Auch die MIC der getesteten Fluorchinolone unterschieden sich in AU und CAMHB nicht deutlich, während die MBC in AU erhöht waren. So betrug die MIC von Ciprofloxacin mit *E. coli* ATCC25922 0,0625 mg/l in CAMHB und 0,09375 mg/l in AU. Die MBC in CAMHB waren für die Carbapenem-sensiblen Stämme in den meisten Fällen niedriger als die MBC in AU. So lag die MBC von Meropenem für *E. cloacae* CHD57 in CAMHB bei 0,25 mg/l, während sie in AU 4-fach höher lag (2 mg/l, Tabelle 17). Lediglich in einem Fall war die MBC in AU um mehr als eine Verdünnungsstufe niedriger als in CAMHB (*E. cloacae* CHD57 mit Ertapenem).

Da der menschliche Urin eine große pH-Spannbreite aufweisen kann und der pH-Wert beispielsweise im Rahmen von HWI oder Erkrankungen wie Diabetes mellitus schwanken kann, wurde die MIC-Bestimmung zusätzlich bei pH 7,2 und 8,2 durchgeführt. So sollte ein möglicher Einfluss des pH-Wertes auf die Antibiotika untersucht werden.

In den Versuchen mit unterschiedlichen pH-Werten zeigten sich keine deutlichen, regelmäßigen Unterschiede (Tabelle 15).

Tabelle 15: MIC-Werte für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme in mg/l in AU bei einem pH von 7,2 / 8,2 und einer Bakterienkonzentration von 10^5 . Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>K. pneumoniae</i> 595	<i>E. cloacae</i> CHD 57
Ciprofloxacin	4 / 4	0,0625 / 0,0625	0,0625 / 0,0625
Colistin	2 / 0,5	2 / 1	1 / 0,5
Levofloxacin	0,25 / 0,25	0,125 / 0,25	0,125 / 0,125
Meropenem	2 / 0,25	0,0625 / 0,0625	0,125 / 0,0625
Nitrofurantoin	32 / 64	64 / 64	64 / 64
Rifampicin	32 / 64	32 / 64	32 / 64
Tigecyclin	4 / 2	1 / 4	1 / 1
Tobramycin	16 / 4	8 / 4	2 / 1

So stimmten die MIC der getesteten Fluorchinolone bei pH 7,2 und 8,2 größtenteils überein. Die MIC für Ciprofloxacin lag bei beiden getesteten pH-Werten beispielsweise für *E. coli* ATCC25922 bei 4 mg/l. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für Nitrofurantoin und Rifampicin (32 mg/l und 64 mg/l) sowie Tigecyclin (4 mg/l und 2 mg/l).

Vergleicht man die Werte bei pH 7,2 und 8,2 mit den Werten in AU, dessen pH etwa 6,3 betrug, findet sich für Meropenem eine schwächere Wirksamkeit bei niedrigerem pH. Bei *K. pneumoniae* 595 betrug die MIC bei höheren pH Werten 0,0625 mg/l, während die MIC bei pH 6,3 5-fach höher lag (0,3125 mg/l). Rifampicin zeigte in niedrigerem pH eine erhöhte Wirksamkeit. Bei *E. coli* ATCC25922 lag die MIC von Rifampicin bei einem pH von 8,2 bei 64 mg/l, während sie bei pH 6,3 4-fach niedriger war (16 mg/l).

Die Ergebnisse der MIC Bestimmung mit einer Bakterienkonzentration von 10^5 und 10^6 CFU/ml unterscheiden sich nicht deutlich (Tabelle 16). So betrug die MIC bei *K. pneumoniae* 595 für Ciprofloxacin in CAMHB sowohl bei 10^5 als auch bei 10^6 0,0625 mg/l. Eine höhere Bakterienkonzentration führte jedoch nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der MIC. Überwiegend zeigten sich keine Unterschiede der MIC bei den beiden getesteten Antibiotikakonzentrationen 10^5 und 10^6 CFU/ml. Ein Anstieg der MIC bei höherer Bakterienkonzentration konnte allerdings vereinzelt ebenfalls beobachtet werden. So betrug die MIC von Tobramycin bei *K. pneumoniae* 595 in CAMHB bei 10^5 0,75 mg/l und bei 10^6 5 mg/l.

Tabelle 16: Median der MIC-Werte für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme in mg/l in CAMHB/AU bei einer Bakterienmenge von 10⁵ und 10⁶ CFU/ml. Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> 595		<i>E. cloacae</i> CHD 57	
	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml
Ciprofloxacin	0,063/ 0,094	0,0625/ 0,09375	0,0625/ 0,0625	0,0625/ 0,125	0,0625/ 0,125	0,0625/0,25
Colistin	3/6	6/6	8,5/1	6/34	2/1,5	5/3
Levofloxacin	0,0625/ 0,25	0,0625/ 0,1875	0,0625/ 0,1875	0,15625/ 0,1875	0,0625/ 0,375	0,0625/0,5
Meropenem	0,125/ 0,125	0,1875/ 0,25	0,1875/ 0,09375	0,375/ 0,75	0,1875/ 0,1875	0,09375/0,25
Nitrofurantoin	12/8	16/12	16/24	48/32	64/32	64/48
Rifampicin	8/12	10/12	12/16	16/24	24/32	16/32
Tigecyclin	0,25/ 0,625	0,25/ 0,75	0,375/0,5	0,25/1	0,625/1,5	0,75/3
Tobramycin	3/6	3/8	0,75/3	5/20	1,25/4	1/6

Die MIC/MBC-Bestimmungen der verschiedenen Antibiotika mit den 6 Carbapenem-resistenten Stämmen zeigten neben der erwarteten Carbapenem-Resistenz auch eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Levofloxacin sowie den Aminoglykosiden Tobramycin und Amikacin.

Die EUCAST legt für Ertapenem in Anwendung auf *Enterobacteriaceae* die Resistenz ab einer MIC von 0,5 mg/l fest (EUCAST 2000). Die von uns gemessenen Werte liegen für alle Spezies mindestens bei 16 mg/l (Tabelle 18). Für Meropenem liegt der Breakpoint für die Resistenz gegenüber *Enterobacteriaceae* bei 8 mg/l (EUCAST 2000). In unseren Versuchen lag die MIC bei allen Spezies mit mindestens 16 mg/l im Bereich der Resistenz.

Bei Ciprofloxacin und Levofloxacin liegen die Breakpoints für eine Resistenz bei 0,5 bzw. 1 mg/l (EUCAST 2000), die MIC-Bestimmung ergab für beide Fluorchinolone in Anwendung auf alle Stämme mindestens Werte von 16 mg/l; die untersuchten Stämme waren also resistent gegenüber Fluorchinolonen. Im Fall von Tobramycin spricht die EUCAST ab einer MIC von 2 mg/l von einer Resistenz (EUCAST 2000). In unseren Versuchen lagen die MIC bei allen untersuchten Stämmen bei 128 mg/l und die Stämme waren damit resistent. Für Amikacin liegt der EUCAST-Breakpoint bei 8 mg/l (EUCAST 2000), die untersuchten Stämme waren mit MIC von 128 mg/l resistent (Tabelle 16).

Die untersuchten *E. coli*-Stämme IR3 und NRZ14408 waren mit einer MIC ≤ 0,5 mg/l in CAMHB sensibel gegenüber Tigecyclin (EUCAST 2000), während die übrigen Stämme mit einer MIC von mindestens 0,75 mg/l resistent waren. Im Fall von Colistin traten MIC oberhalb des Breakpoints von 2 mg/l (EUCAST 2000) nur bei *E. coli* NRZ14408 auf,

welcher neben einer Carbapenem-Resistenz auch eine Colistin-Resistenz trägt. Darüber hinaus zeigten die Carbapenem-resistenten Stämme überwiegend höhere MIC-Werte bezüglich Nitrofurantoin als die 3 sensiblen Stämme. Die untersuchten *E.coli*-Stämme waren mit MIC-Werten unterhalb 64 mg/l sensibel (EUCAST 2000), während die anderen Bakterienspezies mit 128 mg/l resistent gegenüber Nitrofurantoin waren. Insgesamt ließen sich bei den untersuchten *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Stämmen im Vergleich zu den *Escherichia*-Stämmen vermehrt Resistenzen feststellen.

Die Bestimmungen der MIC-Werte in AU zeigten teilweise deutliche Unterschiede zu den Bestimmungen in CAMHB. Die MIC-Werte für Fluorchinolone und Tigecyclin waren in AU im Vergleich zu CAMHB erhöht; die Antibiotika zeigten in AU also eine geringere Aktivität. Im Fall der Carbapenem-sensiblen Stämme war dies auch für Tobramycin der Fall gewesen. Für die Carbapenem-resistenten Stämme konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, da die MIC am Maximum des von uns getesteten Antibiotikakonzentrationsbereichs lagen. So zeigte Ciprofloxacin bei *E. coli* IR3 den größten Unterschied zwischen CAMHB und AU (16 mg/l und 128 mg/l). Ähnliches galt für Levofloxacin mit *E. coli* BAA2469, wo die MIC in AU im Vergleich zu CAMHB ebenfalls 8-fach erhöht war (16 mg/l und 128 mg/l). Im Fall von Tigecyclin lag die MIC in CAMHB bei *K. pneumoniae* BAA2146 bei 4 mg/l, während sie in AU ebenfalls 4-fach höher lag (16 mg/l). Auch die MBC-Werte der Fluorchinolone und von Tigecyclin waren in AU überwiegend höher als in CAMHB (Tabelle 17).

Tabelle 17: Median für die MBC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Dargestellt sind die Median-Werte von 2/3 Messungen. Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>K. pneumoniae</i> 595	<i>E. cloacae</i> CHD 57
Amikacin	32 / 64	32 / 64	16 / 32
Ciprofloxacin	0,0625 / 0,125	0,09375 / 0,1875	0,0625 / 0,5
Colistin	4 / 4	4 / 6	6 / 3
Ertapenem	2 / 1	2 / 2,5	1,5 / 0,52125
Fosfomycin	512 / 272	768 / 1024	768 / 1024
Levofloxacin	0,09375 / 1	0,1875 / 0,375	0,1875 / 0,5
Meropenem	2 / 1	1,125 / 2	0,25 / 2
Nitrofurantoin	16 / 16	64 / 64	128 / 64
Rifampicin	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Tigecyclin	0,5 / 32	64 / 128	64 / 128
Tobramycin	4 / 16	4 / 16	2 / 8

Dies unterstreicht wiederholt die Notwendigkeit, Versuche in unterschiedlichen Medien durchzuführen, um deren Aussagekraft zu erhöhen, da die Ergebnisse in unterschiedlichen Medien, wie sich hier wiederholt zeigte, nicht übereinstimmen müssen.

Im Falle der getesteten Carbapeneme und Nitrofurantoin zeigten sich in AU teilweise niedrigere MIC-Werte im Vergleich zu CAMHB, die Antibiotika zeigten also in AU eine verbesserte Aktivität.

Die MIC- und MBC-Werte von Ertapenem in AU lagen bei fast allen getesteten Stämmen unter denen in CAMHB. Der größte Unterschied zwischen CAMHB und AU zeigte sich bei *E. cloacae* BAA2468, wo die MIC in AU 8-fach niedriger war als in CAMHB. Im Fall von Meropenem lag die MIC in AU nur bei *E. cloacae* BAA2468 unter den MIC in CAMHB (16-fach niedriger), die MBC von Meropenem waren in AU überwiegend höher. Die MIC von Nitrofurantoin in AU waren für die getesteten *E. coli*-Stämme im Vergleich zu den MIC in CAMHB um das 2- bis 4-fache niedriger, während bei den übrigen Stämmen keine Unterschiede zwischen CAMHB und AU festgestellt werden konnten. Auch für die MBC von Nitrofurantoin zeigte sich zwischen den Medien kein Unterschied.

Tabelle 18: Median für die MIC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> IR3	<i>E. coli</i> NRZ14408	<i>E. coli</i> BAA2469	<i>K. pneumoniae</i> BAA1705	<i>K. pneumoniae</i> BAA2146	<i>E. cloacae</i> BAA2468
Amikacin	128 / 128	64 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Ciprofloxacin	16 / 128	32 / 128	128 / 128	96 / 128	128 / 128	128 / 128
Colistin	2 / 2	8 / 64	1 / 2	1,5 / 2	2 / 4	2 / 2
Ertapenem	128 / 64	64 / 16	64 / 32	256 / 128	128 / 128	128 / 16
Fosfomycin	384 / 16	320 / 64	320 / 32	512 / 512	256 / 512	1024 / 1024
Levofloxacin	16 / 80	16 / 64	16 / 128	128 / 128	128 / 128	80 / 128
Meropenem	32 / 16	16 / 16	16 / 16	128 / 128	64 / 128	128 / 8
Nitrofurantoin	64 / 16	64 / 32	20 / 8	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Rifampicin	32 / 16	256 / 256	8 / 16	16 / 32	32 / 32	32 / 32
Tigecyclin	0,25 / 1	0,5 / 2	0,75 / 2	1 / 4	4 / 16	4 / 8
Tobramycin	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128

Tabelle 19: Median für die MBC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

	<i>E. coli</i> IR3	<i>E. coli</i> NRZ14408	<i>E. coli</i> BAA2469	<i>K. pneumoniae</i> BAA1705	<i>K. pneumoniae</i> BAA2146	<i>E. cloacae</i> BAA2468
Amikacin	256 / 256	128 / 256	256 / 256	256 / 256	256 / 256	256 / 256
Ciprofloxacin	64 / 128	64 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Colistin	2 / 10	24 / 96	3 / 10	6 / 12	8 / 16	2 / 5
Ertapenem	256 / 128	192 / 128	192 / 256	256 / 192	256 / 256	256 / 128
Fosfomycin	768 / 32	768 / 512	768 / 544	1024 / 512	1024 / 1024	1024 / 1024
Levofloxacin	32 / 64	32 / 128	32 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Meropenem	48 / 128	48 / 64	16 / 64	192 / 128	128 / 128	128 / 128
Nitrofurantoin	128 / 128	64 / 64	16 / 16	128 / 128	128 / 128	128 / 128
Rifampicin	48 / 32	192 / 128	64 / 128	64 / 160	192 / 192	128 / 128
Tigecyclin	4 / 20	1 / 3	1 / 10	8 / 8	128 / 128	64 / 128
Tobramycin	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128	128 / 128

3.2 Checkerboard Assays

In den Checkerboard Assays sollten synergistische Antibiotikakombinationen gefunden werden. Es erfolgte die Testung von Meropenem plus eines der 8 weiteren Antibiotika in Anwendung auf alle 9 Bakterienstämme. Die zuvor gefundenen MIC-Werte wurden verwendet, um die in den Checkerboards zu testende Range der einzelnen Antibiotika festzulegen.

Für die drei Carbapenem-sensiblen Stämme zeigte sich in der überwiegenden Zahl der Fälle durch die Kombinationstherapie in CAMHB kein und in AU ein nur geringer Effekt auf die MIC-Werte von Meropenem. Nur die Kombination aus Meropenem und Fosfomycin führte zu einer deutlichen Reduktion der MIC bei allen drei Stämmen und damit zu einer verbesserten Wirksamkeit. In CAMHB zeigte Fosfomycin als Kombinationspartner von Meropenem in Anwendung auf alle drei Stämme einen Synergismus mit verstärkter Wirkung. Fosfomycin führte bei *E. coli* ATCC25922 zu einer 8-fachen Reduktion der MIC-Werte in beiden Medien und damit auch zu einer synergistischen Σ FICI (Tabelle 20 und 21).

Tabelle 20: Fold change (fc) der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Selbst erstellt.

Meropenem +	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> 595		<i>E. cloacae</i> CHD 57	
	fc	ΣFICI	fc	ΣFICI	fc	ΣFICI
Ciprofloxacin	1	2	1	2	1	2
Colistin	1	2	1	2	1	2
Fosfomycin	8	0,188	16	0,563	3	0,532
Levofloxacin	1	2	1	2	1	2
Nitrofurantoin	2	0,875	1	2	1	2
Rifampicin	1	2	1	2	1	2
Tigecyclin	1	2	1	2	8	0,375
Tobramycin	1,5	2	1	2	16	0,313

Tabelle 21: Fold change (fc) der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Selbst erstellt.

Meropenem +	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> 595		<i>E. cloacae</i> CHD 57	
	fc	ΣFICI	fc	ΣFICI	fc	ΣFICI
Ciprofloxacin	1	2	2	0,563	1	2
Colistin	1	2	1	2	2	1
Fosfomycin	8	0,25	2	0,75	64	0,516
Levofloxacin	1,5	0,565	2	0,625	1	2
Nitrofurantoin	4	0,75	2	1	2	1
Rifampicin	2	0,75	32	0,516	1	2
Tigecyclin	5	0,813	1	2	2	0,531
Tobramycin	2	0,625	2	0,625	32	0,531

Für *K. pneumoniae* 595 und *E. cloacae* CHD57 verhielt sich die Kombination aus Meropenem und Fosfomycin in beiden Medien additiv. Es kam in AU bei *E. cloacae* CHD57 zu einer 64-fachen Reduktion der MIC (vgl. Tabelle 21) sowie zu einer 16-fachen Reduktion der MIC in CAMHB bei *K. pneumoniae* 595 (Tabelle 20).

Weitere Synergismen zeigten sich bei Meropenem in Kombination mit Tobramycin sowie Tigecyclin für *E. cloacae* CHD57 in CAMHB. Eine 8- (Tigecyclin) bzw. 16-fache (Tobramycin) Reduktion der MIC konnte erzielt werden. Die Σ FICI waren mit 0,375 und 0,313 im synergistischen Bereich. In AU führte die Kombination mit Tobramycin zu einer 32-fachen Reduktion der MIC, die Σ FICI war mit 0,531 im additiven Bereich.

In AU zeigte sich außerdem in der Kombination von Meropenem und Rifampicin mit *K. pneumoniae* 595 mit einer 32-fachen Reduktion der MIC ebenfalls ein additiver Effekt.

In Bezug auf die 6 Carbapenem-resistenten Stämme zeigten die Checkerboard Assays in CAMHB für die Kombination von Meropenem mit Levofloxacin, Colistin, Fosfomycin und Rifampicin am häufigsten einen synergistischen Effekt. Die MIC-Werte konnten um mindestens das Vierfache im Vergleich zu Meropenem allein gesenkt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten in AU erzielt werden.

Colistin zeigte als Kombinationspartner von Meropenem in CAMHB für alle getesteten Stämme außer *E. coli* NRZ14408 einen Synergismus. So führte die Kombination aus Colistin und Meropenem bei *K. pneumoniae* BAA1705 in CAMHB zur deutlichsten MIC-Reduktion (24-fach). Die Kombination von Meropenem und Colistin in CAMHB war bei *E. coli* NRZ14408 mit einer $\Sigma FICI$ von 0,625 additiv, konnte also dennoch die Wirkung verbessern. In AU war die Kombination von Colistin und Meropenem im Vergleich zu CAMHB weniger wirksam. Ein Synergismus mit $\Sigma FICI < 0,5$ wurde nur bei *E. coli* IR3 (0,141), *E. coli* BAA2469 (0,157) sowie *E. cloacae* BAA2468 (0,344) beobachtet. Für die anderen getesteten Stämme wirkte die Kombination additiv.

Fosfomycin zeigte in beiden Medien für alle untersuchten Stämme, außer *E. cloacae* BAA2468, einen Synergismus mit Meropenem. Die stärkste Reduktion der MIC von Meropenem in Kombination mit Fosfomycin erfolgte in CAMHB für *K. pneumoniae* BAA1705 (24-fach, Tabelle 23) sowie für *E. coli* BAA2469 in AU (24-fach, Tabelle 23). Bezüglich *E. cloacae* BAA2468 zeigte die Kombination aus Fosfomycin und Meropenem mit $\Sigma FICI$ von 0,625 (CAMHB) und 0,75 (AU) eine additive Wirkung.

Rifampicin war mit Meropenem in CAMHB in 4 von 6 und in AU in 3 von 6 Bakterienstämmen synergistisch wirksam. Die größte MIC-Reduktion konnte die Kombination mit Rifampicin bei *K. pneumoniae* BAA1705 erzielen (40-fach in CAMHB, 20-fach in AU, Tabelle 22 und 23), die Wirkung war additiv ($\Sigma FICI$ 0,525 in CAMHB, 0,578 in AU). Ein Synergismus wurde in CAMHB unter anderem für *K. pneumoniae* BAA2146 mit einem $\Sigma FICI$ von 0,407 beobachtet.

Levofloxacin konnte in CAMHB bei 3 von 6 Bakterienstämmen einen synergistischen Effekt mit Meropenem erzielen. Es kam beispielsweise für *K. pneumoniae* BAA2146 zu einer 20fachen Reduktion der MIC mit einer $\Sigma FICI$ von 0,453. In Anwendung auf die 3 anderen Bakterienstämme konnte ein additiver Effekt beobachtet werden. Auffällig war, dass allein die Kombination aus Meropenem und Levofloxacin in AU im Vergleich zu CAMHB deutlich schlechter wirksam war und die Reduktion der MIC geringer ausfiel. Die MIC-Reduktion betrug beispielsweise für *E. coli* NRZ14408 in AU nur noch das 3-fache, für die *Klebsiella*-Stämme konnte nicht einmal mehr eine additive Wirkung beobachtet werden ($\Sigma FICI > 2$).

Vereinzelte Synergismen traten außerdem in der Kombination von Nitrofurantoin mit Meropenem auf. In CAMHB konnte der Synergismus für *E. coli* NRZ14408 gezeigt werden (Σ FICI 0,5), in AU zeigte sich ein Synergismus in Anwendung der Kombination aus Nitrofurantoin und Meropenem auf *E. coli* IR3 (Σ FICI 0,313). Tigecyclin zeigte in AU in Anwendung auf 2 Bakterienstämme einen Synergismus mit Meropenem, in CAMHB zeigte sich ein Synergismus für *E. cloacae* BAA2468 (Σ FICI 0,375). Tobramycin führte mit *K. pneumoniae* BAA1705 als Kombinationspartner von Meropenem zu einer additiven Wirkung mit einer deutlichen MIC-Reduktion von 32 in CAMHB und 16 in AU.

Es zeigten sich wie bereits in den ersten Versuchsschritten teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen in CAMHB und AU. In der MIC-Bestimmung waren Fluorchinolone, Tobramycin und Tigecyclin in AU schlechter wirksam gewesen. Dies bestätigte sich in den Checkerboard Assays insbesondere für Levofloxacin.

Tabelle 22: Fold change (fc) der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

Meropenem +	<i>E. coli</i> IR3		<i>E. coli</i> NRZ14408		<i>E. coli</i> BAA2469		<i>K. pneumoniae</i> BAA1705		<i>K. pneumoniae</i> BAA2146		<i>E. cloacae</i> BAA2468	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Ciprofloxacin	1	2	8	0,625	2	1	48	0,532	1,5	1	3	0,875
Colistin	8,5	0,313	8	0,625	8	0,438	24	0,422	8	0,375	48	0,289
Fosfomycin	10	0,407	6	0,328	18	0,180	24	0,251	8	0,375	4	0,625
Levofloxacin	8	0,5	8	0,625	6	0,563	20	0,0578	20	0,453	20	0,328
Nitrofurantoin	1	2	4	0,5	16	0,563	2	0,563	2	1	8	0,625
Rifampicin	12	0,375	5	0,813	12	0,376	40	0,525	4	0,407	18	0,391
Tigecyclin	2	1	16	0,563	5	0,688	1	2	8	0,625	4	0,375
Tobramycin	2	1	4	0,375	1	2	32	0,53	1	2	2	0,75

Tabelle 23: Fold change (fc) der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

Meropenem +	<i>E. coli</i> IR3		<i>E. coli</i> NRZ14408		<i>E. coli</i> BAA2469		<i>K. pneumoniae</i> BAA1705		<i>K. pneumoniae</i> BAA2146		<i>E. cloacae</i> BAA2468	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Ciprofloxacin	8	0,375	4	0,75	2	1	1	2	1,5	0,75	2,5	0,75
Colistin	12	0,141	8	0,625	12	0,157	17	0,766	5	0,813	4	0,344
Fosfomycin	4	0,5	10	0,407	24	0,297	20	0,328	4	0,5	2,5	0,75
Levofloxacin	8	0,5	3	0,625	12	0,407	1	2	1	2	2	0,438
Nitrofurantoin	4	0,313	8	0,625	4	0,75	1	2	1	2	1	2
Rifampicin	12	0,375	3	0,875	8	0,265	20	0,578	6	0,438	3	0,563
Tigecyclin	6	0,438	8	0,625	8	0,625	2	1	16	0,188	4	0,75
Tobramycin	1	2	1	2	1	2	16	0,563	1	2	1	2

Die vielversprechenden Kombinationen wurden anschließend auch mit Ertapenem als Vertreter der Carbapeneme durchgeführt. Ertapenem wurde später im Blasen-Modell als Vertreter der Carbapeneme bevorzugt, da hier eine einmalige Gabe pro Tag üblich ist und sich Ertapenem daher aufgrund der einfacheren Handhabung besser für eine Simulation eignete. Auch hier konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 24-27).

Betrachtet man die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme, zeigte sich hier erneut eher ein geringer Effekt der Kombinationstherapie. Wie bereits in der Kombination mit Meropenem zeigte sich jedoch in beiden Medien für zwei der 3 untersuchten Stämme in der Kombination aus Ertapenem und Fosfomycin ein Synergismus, für *E. cloacae* CHD57 war die Kombination additiv. So betrug die Σ FICI in CAMHB für *E. coli* ATCC25922 0,281 und es kam zu einer 4-fachen Reduktion der MIC (vgl. Tabelle 24). In AU führte die Kombination mit Fosfomycin bei *E. cloacae* CHD57 sogar zu einer 8-fachen MIC-Reduktion mit einer Σ FICI von 0,25 (Tabelle 25). Wie auch bereits in der Kombination mit Meropenem zeigte Tigecyclin in Kombination mit Ertapenem bei *E. cloacae* CHD57 in beiden Medien eine synergistische Wirkung.

Tabelle 24: Fold change (fc) der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Selbst erstellt.

Ertapenem +	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> 595		<i>E. cloacae</i> CHD 57	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Colistin	1	2	1	2	1	2
Fosfomycin	4	0,281	4	0,375	2	0,563
Levofloxacin	1	2	1	2	1	2
Rifampicin	1	2	1	2	2	1
Tigecyclin	1	2	2	0,531	16	0,078

Tabelle 25: Fold change (fc) der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme. Selbst erstellt.

Ertapenem +	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>K. pneumoniae</i> 595		<i>E. cloacae</i> CHD 57	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Colistin	1	2	2	1	4	0,75
Fosfomycin	8	0,25	1	2	8	0,25
Levofloxacin	1	2	1	2	1	2
Rifampicin	2	1	1	2	4	0,75
Tigecyclin	2	0,625	1	2	16	0,188

Betrachtet man die Ergebnisse der 6 Carbapenem-resistenten Bakterienstämme, zeigen sich hier ebenfalls ähnliche Ergebnisse für die Kombination mit Ertapenem wie für die Kombination mit Meropenem.

In CAMHB zeigte Fosfomycin in der Kombination mit Ertapenem bei 5 von 6 Bakterienstämmen einen synergistischen Effekt (Tabelle 26). So führte die Kombination beispielsweise für *K. pneumoniae* BAA1705 zu einer 16-fachen MIC-Reduktion mit einer Σ FICI von 0,125. Für *E. cloacae* BAA2468 zeigte sich eine 32-fache MIC-Reduktion mit additiver Wirkung (Σ FICI 0,531). Diese Ausnahme war bereits in der Kombination mit Meropenem aufgetreten. Auch in AU zeigte die Kombination aus Fosfomycin und Ertapenem bei 5 von 6 Bakterienstämmen einen synergistischen Effekt.

Rifampicin zeigte als Kombinationspartner von Ertapenem in CAMHB ebenfalls bei 5 von 6 der Carbapenem-resistenten Bakterienstämme einen Synergismus. Für *E. cloacae* BAA2468 betrug die Σ FICI 0,141 und es kam zur größten Reduktion der MIC (64-fach). Allein in Anwendung auf *K. pneumoniae* BAA1705 konnte die Kombination mit Rifampicin keinen zusätzlichen Effekt erzielen (Σ FICI 2). Hier war bereits in der Kombination mit Meropenem nur ein additiver Effekt aufgetreten. In AU konnte bei 3 von 6 Bakterienstämmen ein Synergismus gezeigt werden (Tabelle 27), die MIC von Ertapenem konnte um das 16- bis 32-fache gesenkt werden. Bei den übrigen 3 Stämmen

konnte eine 4- bis 16-fache MIC-Reduktion mit Σ FICI entsprechend einer additiven Wirkung festgestellt werden.

Levofloxacin zeigte in CAMHB in 3 von 6 Bakterienstämmen einen Synergismus mit Ertapenem, in AU war dies bei 2 von 6 der Fall. In CAMHB konnte bei *E. coli* NRZ14408 eine 12-fache MIC-Reduktion mit einer Σ FICI von 0,313 erreicht werden, während in AU hier mit einer Σ FICI von 0,75 ein additiver Effekt gezeigt werden konnte. Ein Synergismus zwischen Levofloxacin und Ertapenem in AU konnte bei *E. coli* IR3 gezeigt werden (Σ FICI 0,5). Die Unterschiede zwischen CAMHB und AU waren weniger deutlich als in der Testung mit Meropenem als Kombinationspartner.

Im Fall von Colistin und Tigecyclin fielen die Ergebnisse in Kombination mit Ertapenem schwächer synergistisch aus als in Kombination mit Meropenem. Für Tigecyclin in CAMHB ließ sich lediglich für *K. pneumoniae* BAA2146 ein Synergismus mit Ertapenem zeigen (4-fache MIC-Reduktion). In AU zeigte sich in Anwendung von Tigecyclin und Ertapenem auf *E. coli* NRZ14408 (Σ FICI 0,313) und *E. coli* BAA2469 (Σ FICI 0,375) ein synergistischer Effekt.

Für die Kombination aus Colistin und Ertapenem zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen CAMHB und AU. Während die Kombination in CAMHB nur für *K. pneumoniae* BAA2146 mit einer Σ FICI von 0,25 einen synergistischen Effekt erzielen konnte, war die Kombination aus Colistin und Ertapenem in AU auf 5 von 6 Bakterienstämmen synergistisch wirksam. Insgesamt war ein deutlich zu beobachtender Effekt des Mediums in den Checkerboard Assays weniger häufig zu beobachten als in der zuvor erfolgten Einzeltestung der Antibiotika. Ausnahmen bilden wie oben erwähnt Levofloxacin und Colistin.

Tabelle 26: Fold change (fc) der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

Ertapenem +	<i>E. coli</i> IR3		<i>E. coli</i> NRZ14408		<i>E. coli</i> BAA2469		<i>K. pneumoniae</i> BAA1705		<i>K. pneumoniae</i> BAA2146		<i>E. cloacae</i> BAA2468	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Colistin	32	0,531	32	0,75	1	2	1	2	16	0,25	8	0,625
Fosfomycin	4	0,5	32	0,281	16	0,125	8	0,375	4	0,375	32	0,531
Levofloxacin	128	0,508	12	0,313	8	0,375	16	0,313	16	0,563	25	0,75
Rifampicin	32	0,281	6	0,438	16	0,188	1	2	16	0,313	64	0,141
Tigecyclin	4	0,75	16	0,563	1	2	32	0,531	4	0,5	64	0,53

Tabelle 27: Fold change (fc) der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme. Selbst erstellt.

Ertapenem +	<i>E. coli</i> IR3		<i>E. coli</i> NRZ14408		<i>E. coli</i> BAA2469		<i>K. pneumoniae</i> BAA1705		<i>K. pneumoniae</i> BAA2146		<i>E. cloacae</i> BAA2468	
	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI	fc	Σ FICI
Colistin	32	0,156	8	0,625	4	0,5	8	0,25	8	0,375	8	0,25
Fosfomycin	8	0,5	16	0,5	32	0,188	8	0,25	32	0,531	4	0,313
Levofloxacin	4	0,5	4	0,75	1	2	16	0,563	4	0,5	2,5	0,75
Rifampicin	32	0,281	4	0,75	16	0,563	16	0,313	32	0,156	4	0,75
Tigecyclin	4	0,75	32	0,313	8	0,375	16	0,563	2	1	1	2

3.3 Dynamisches Blasen-Modell

Zur Simulation der Situation im menschlichen Körper wurde in einem Blasen-Modell unter dynamischen Gegebenheiten mit einem stetigen Zu- und Abfluss die Pharmakokinetik in vivo simuliert. Im Blasen-Modell wurden diejenigen Antibiotika-Kombinationen getestet, welche in den Checkerboard Assays besonders wirksam gewesen waren. Als besonders wirksam wurden die Antibiotikakombinationen erachtet, die sowohl niedrige FICI-Werte aufwiesen, als auch bei möglichst vielen verschiedenen Bakterienstämmen wirksam waren. Getestet wurden die Kombinationen von Ertapenem mit jeweils Levofloxacin, Rifampicin und Fosfomycin. Es wurde jeweils nur eine Einzeldosis in der in der Klinik üblichen Dosierung verabreicht. Die getesteten Keime waren die 4 Carbapenem-resistenten Stämme *E. coli* NRZ14408, *E. coli* BAA2469, *K. pneumoniae* BAA1705 und *E. cloacae* BAA2468.

Wie unter Methoden beschrieben, wurden die Antibiotikakonzentrationen mittels der Eliminationskonstanten und der Recoveryrate im Urin bei einer angenommenen durchschnittlichen Urinproduktionsrate von 1,5 Litern pro Stunde und einer Blasenentleerung alle 3 Stunden berechnet. Zu allen Probeentnahme-Zeitpunkten wurde die Antibiotika-Konzentration in den Blasen-Kompartimenten bestimmt, um zu überprüfen, ob die tatsächliche Konzentrationen auch den berechneten, angestrebten Konzentrationen entsprachen. Die gemessene Konzentration lag jeweils leicht unter den angestrebten, errechneten AB-Konzentrationen. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die eingesetzte Anfangsmenge der Antibiotika im „Sekundärharn“ also dem der Blase vorgeschalteten Element, geringer war als angestrebt.

Die angestrebte Menge Levofloxacin im Sekundärharn betrug 389 mg, die tatsächlich in das Sekundärharn-Kompartiment gegebene Menge betrug 295 mg (Abb. 7A). Die dann

maximal im Blasenkompartiment gemessene Konzentration betrug nach 2 Stunden 358 mg/l. Die nach Berechnung zu erreichende Konzentration betrug 529 mg/l.

Für Rifampicin war eine Menge von 90 mg angestrebt worden. Die tatsächlich gemessene Menge betrug 64 mg. So konnte nach einer Stunde eine maximale Konzentration von Rifampicin von 175 mg/l gemessen werden. Rechnerisch hätte die Konzentration nach einer Stunde 156 mg/l betragen müssen (Abb. 7B)

Im Fall von Ertapenem betrug die angestrebte Menge 497mg, die im Sekundärharn des Blasen-Modells gemessene betrug 481. Die maximal erreichte Konzentration lag hiermit nach 4 Stunden bei 785 mg/l. Rechnerisch lag die zu erreichende Konzentration bei 907 mg/l (Abb. 7C)

Die berechnete Menge Fosfomycin betrug 1170 mg. Im Sekundärharn des Blasen-Modells lag dann die gemessene Menge bei 1054 mg zugegebener Menge Fosfomycin. Die maximale Konzentration wurde mit 2724 mg/l nach vier Stunden erreicht. Der berechnete Wert wäre bei 2308 mg/ml gelegen (Abb. 7D).

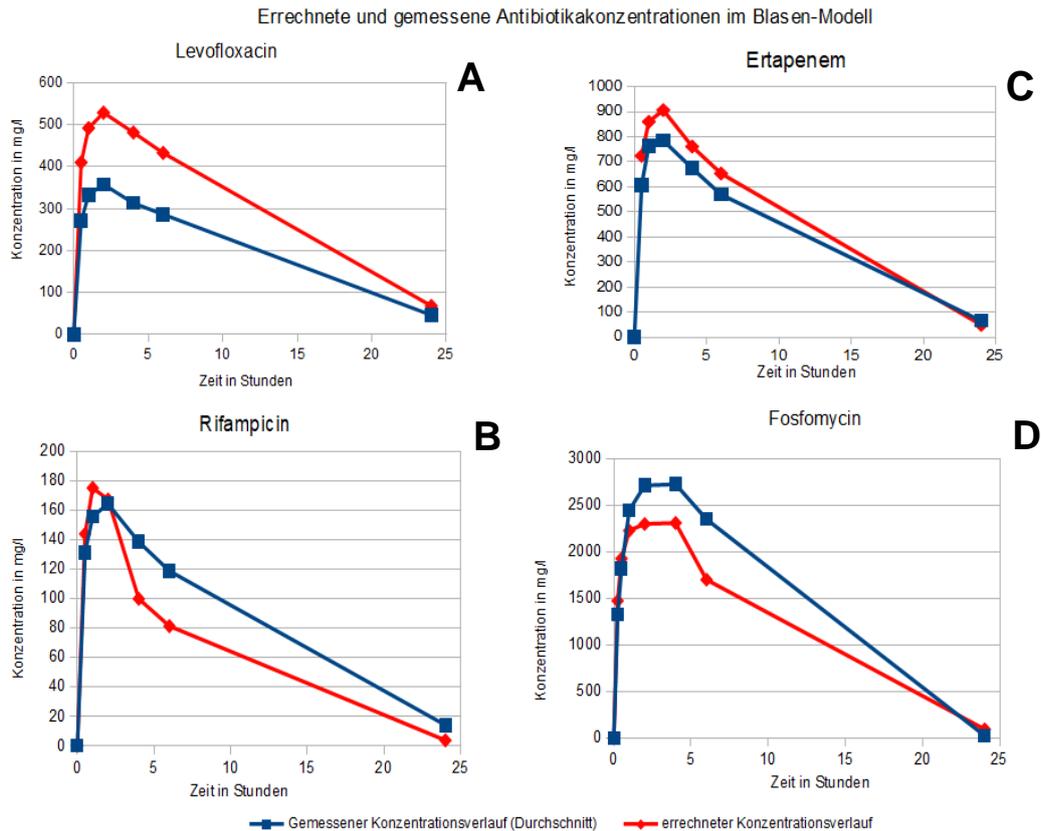


Abbildung 7: Im Blasen-Kompartiment des Blasen-Modells gemessene Antibiotikakonzentrationen für A) Levofloxacin, B) Rifampicin, C) Ertapenem und D) Fosfomycin in mg/ml, dargestellt in blau. Dargestellt ist jeweils der berechnete Durchschnitt aus vier Messungen. In rot dargestellt ist die berechnete Antibiotikakonzentration, die im Blasen-Modell hätte erreicht werden sollen. Abbildung selbst erstellt.

Mit Ertapenem allein kam es initial bei allen 4 untersuchten Stämmen zu einem Abfall der Bakterienanzahl unterhalb die Nachweisgrenze. In allen Fällen kam es allerdings zu einem erneuten Wachstum der Bakterien nach spätestens 24 Stunden (Abbildung 8-10). Ähnlich verhielten sich Levofloxacin und Fosfomycin allein. Hier kam es bei *E. coli* BAA2469 und *K. pneumoniae* zu einem erneuten Wachstum (Abbildung 8, 10). Im Falle von *E. cloacae* BAA2468 und *E. coli* NRZ14408 reichte Levofloxacin allein aus, um die Bakterienzahlen über 48 Stunden unter der Nachweisgrenze zu halten. Bei *E. coli* BAA2469 war Fosfomycin ausreichend, um das Bakterium abzutöten (Abbildung 10C). Rifampicin allein konnte die Bakterienzahlen bei allen getesteten Stämmen zwar verringern, es kam jedoch nie zu einem dauerhaften Abfall unterhalb die Nachweisgrenze (Abbildung 9).

Bakterienwachstum unter Levofloxacin und Ertapenem

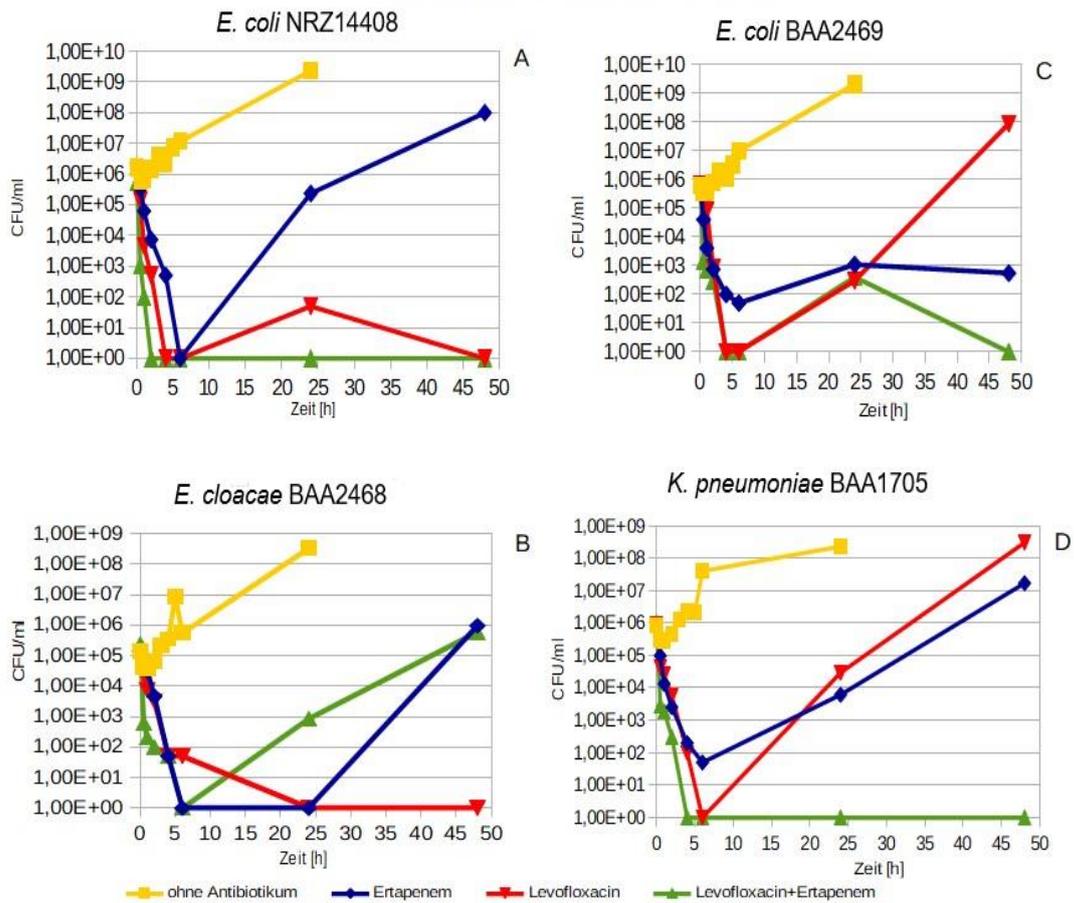


Abbildung 8: Bakterienwachstum in CFU/ml über 48 Stunden für *E. coli* NRZ 14408 (A), *E. cloacae* BAA 2468 (B), *E. coli* BAA 2469 (C) und *K. pneumoniae* BAA 1705 (D) ohne Antibiotikum (gelb), unter Ertapenem (blau), unter Levofloxacin (rot) sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Levofloxacin (grün).
Abbildung selbst erstellt.

Bakterienwachstum unter Rifampicin und Ertapenem

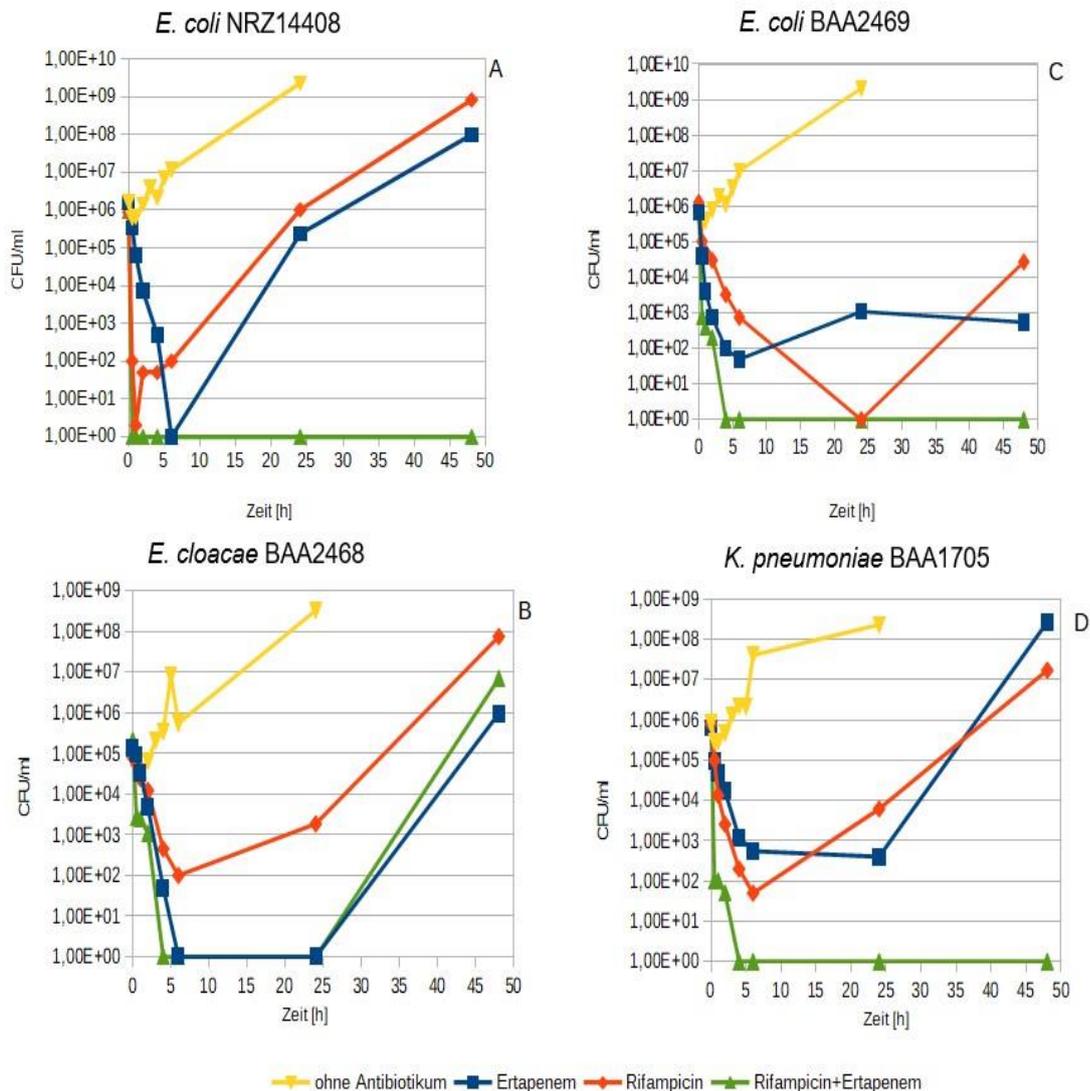


Abbildung 9: Bakterienwachstum in CFU/ml über 48 Stunden für *E. coli* NRZ 14408 (A), *E. cloacae* BAA 2468 (B), *E. coli* BAA 2469 (C) und *K. pneumoniae* BAA 1705 (D) ohne Antibiotikum (gelb), unter Ertapenem (blau), unter Rifampicin (rot) sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Rifampicin (grün). Abbildung selbst erstellt.

Bezüglich der Kombinationstherapie zeigte sich in der Kombination von Ertapenem mit Levofloxacin, Fosfomycin und Rifampicin ein verbesserter bakterizider Effekt auf die *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämme verglichen mit den einzelnen Antibiotika. Die Bakterienzahlen fielen spätestens nach 8 Stunden unter die Nachweisgrenze und verblieben für den gesamten beobachteten Zeitraum von 48 Stunden auf diesem Niveau (Abbildung 8, 9 und 10 jeweils A, C, D).

Bakterienwachstum unter Fosfomycin und Ertapenem

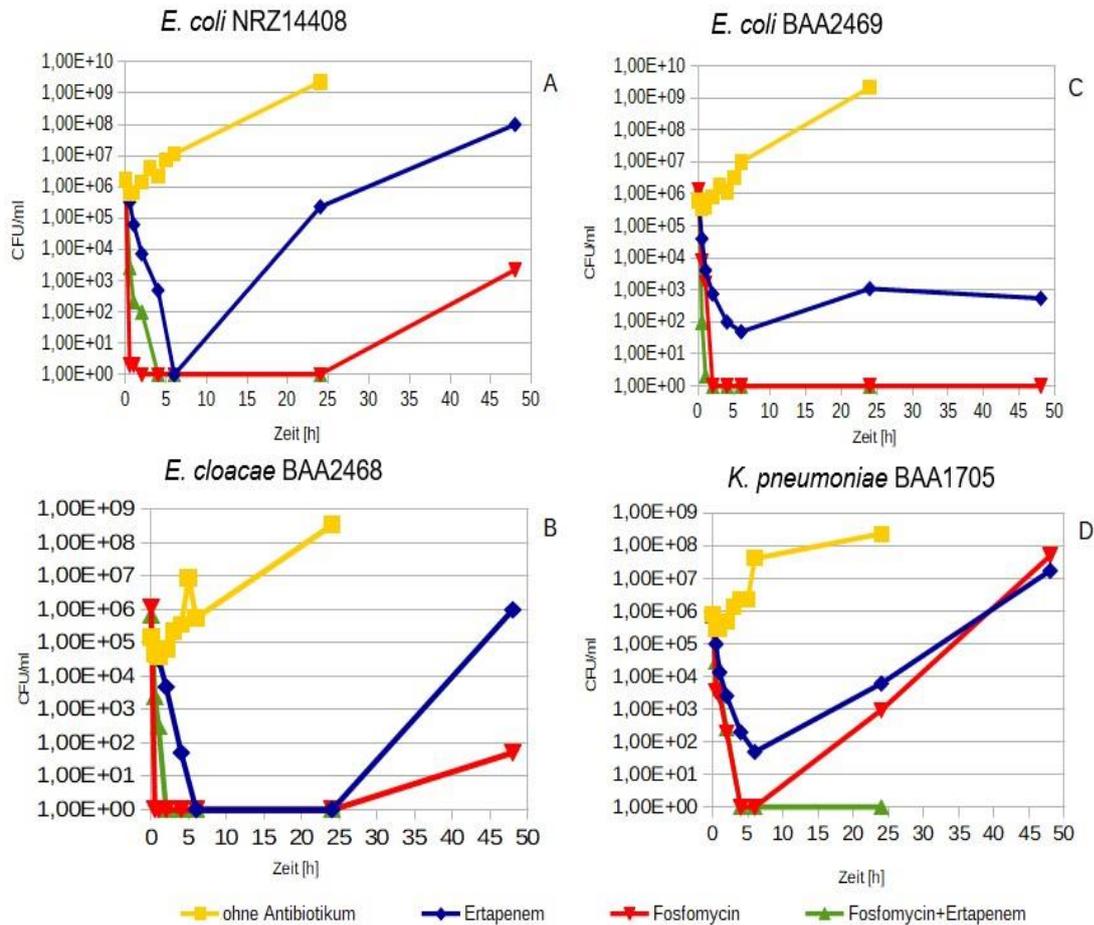


Abbildung 10: Bakterienwachstum in CFU/ml über 48 Stunden für *E. coli* NRZ 14408 (A), *E. cloacae* BAA 2468 (B), *E. coli* BAA 2469 (C) und *K. pneumoniae* BAA 1705 (D) ohne Antibiotikum (gelb), unter Ertapenem (blau), unter Rifampicin (rot) sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Rifampicin (grün).
Abbildung selbst erstellt.

Der *E. cloacae*-Stamm konnte unter der Kombinationstherapie von Ertapenem und Fosfomycin unterhalb der Nachweisgrenze gehalten werden (Abbildung 10B). Die anderen Kombinationstherapien zeigten bezüglich dem *E. cloacae*-Stamm keine Überlegenheit gegenüber der Einzeltherapie, sondern es kam auch unter der Kombinationstherapie zu einem erneuten Wachstum des Erregers nach spätestens 24 Stunden (Abbildung 8B, 9B).

Die durchgeführte Resistenztestung zur Kontrolle einer gehäuften Entstehung von Resistenzen zeigte in der Einzeltherapie erhöhte Resistenzraten auch unter ausreichend hohen Antibiotikakonzentrationen.

In den Versuchen mit Ertapenem allein kam es im Versuchsverlauf bei allen Stämmen außer *E. cloacae* BAA2468 zu einer Selektion Ertapenem-resistenter Klone; die Therapie mit Ertapenem allein führte zu einer deutlich erhöhten Rate resistenter Keime bei 3 der 4 untersuchten Stämme nach 48 Stunden (Abbildung 11). So lag der Anteil resistenter Klone (Wachstum bei 128 µg/ml Ertapenem) von *E. coli* NRZ14408 an der Zahl insgesamt gewachsener Bakterien zu Versuchsbeginn im nicht nachweisbaren Bereich, nach 48 Stunden jedoch bei etwa 86 % (insgesamt gewachsen; 1,00E+08 CFU/ml; davon resistent: 8,60E+07 CFU/ml). Im Fall von *E. cloacae* BAA2468 kam es im Gegenteil zu einem Absinken des Anteils resistenter Klone im Versuchszeitraum (Abbildung 11). Der Anteil Ertapenem-resistenter Klone lag zu Versuchsbeginn bei 100%, nach 48 Stunden sank er auf 13,3% (insgesamt gewachsen: 9,60E+05 CFU/ml; davon resistent: 1,28E+05 CFU/ml). Es könnte unter der alleinigen Therapie mit Ertapenem also bei unzureichender Therapie zur Resistenzbildung kommen. Die Kombinationstherapie aus Ertapenem mit Rifampicin oder Fosfomycin konnte hingegen bei allen Stämmen außer *E. cloacae* BAA2468 die Selektion Ertapenem-resistenter Keime verhindern. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass durch die genannten Kombinationen alle Bakterien abgetötet wurden und so keine Selektion resistenter Klone stattfinden konnte. Während beispielsweise bei Versuchsbeginn noch 13,6% der *K. pneumoniae* BAA1705-Klone gegen Ertapenem resistent waren, waren nach Kombinationstherapie mit Ertapenem und Rifampicin keine resistenten Klone mehr nachweisbar, während aber auch im Blasenmodell kein Wachstum nachweisbar gewesen war. Bei *E. cloacae* BAA2468 führte die Therapie mit Ertapenem und Rifampicin zu erhöhten Raten resistenter Klone. Zu Versuchsbeginn waren etwa 100% der Keime resistent gegen Ertapenem und auch nach 48 Stunden lag der Anteil resistenter Klone noch bei etwa 75% (insgesamt gewachsen: 6,97E+06 CFU/ml; davon resistent: 5,27E+06 CFU/ml). Wenn also die Kombinationstherapie nicht ausreichend wirksam ist, um Bakterien abzutöten, könnte hierbei eine problematische Selektion Ertapenem-resistenter Klone stattfinden. Im Fall von *E. cloacae* BAA2468 erhöhte allein die Kombination aus Levofloxacin und Ertapenem die Selektion resistenter Klone nicht, während es bei den anderen Kombinationstherapien über den beobachteten Zeitraum zu einem erhöhten Anteil resistenter Klone kam. Zu Versuchsbeginn lag der Anteil resistenter *E. cloacae* BAA2468-Klone bei etwa 34,5 % (insgesamt gewachsen: 2,40E+07 CFU/ml; davon resistent 8,28E+06), nach 48 Stunden bei 18,6%, also in einem ähnlichen Bereich (Abbildung 11). Bei allen anderen untersuchten Stämmen führte die Kombinationstherapie aus Ertapenem und Levofloxacin jedoch zu einem Anstieg des Anteils Ertapenem-resistenter Klone. So waren für *E. coli* NRZ14408 zu Versuchsbeginn unter Levofloxacin und Ertapenem keine resistenten Klone nachweisbar, nach 48

Stunden lag der Anteil jedoch bei rund 100% (insgesamt gewachsen: unter der Nachweisgrenze; davon resistent: 1,80E+03 CFU/ml). Somit erscheint auch die Kombination aus Ertapenem und Levofloxacin bezüglich einer Resistenzentwicklung riskant, auch wenn es nicht zu einem nachweisbaren erneuten Wachstum von Bakterien im Blasenmodell gekommen ist. Es könnte sich daher hier natürlich um eine Verunreinigung handeln, die Ergebnisse passen jedoch zu den Resultaten anderer Arbeiten (siehe Diskussion).

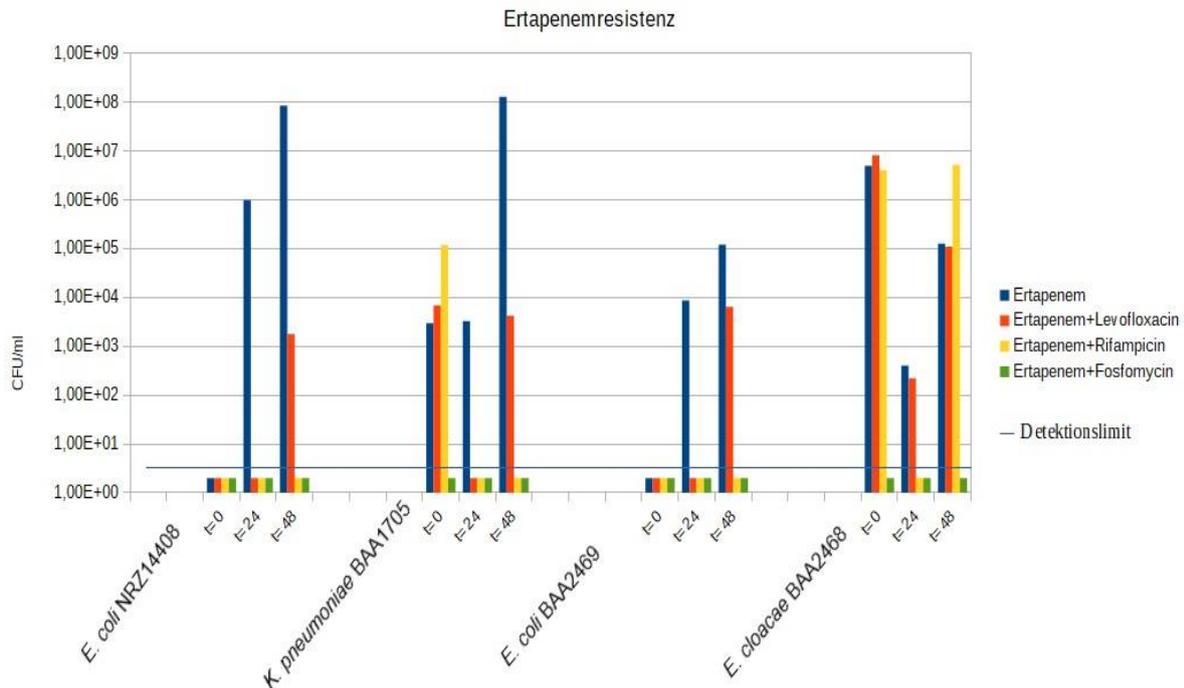


Abbildung 11: Ertapenem-resistente Klone in CFU/ml nach 0, 24 und 48 Stunden für die vier untersuchten Bakterienstämme unter Therapie mit Ertapenem (blau), Ertapenem und Levofloxacin (rot), Ertapenem und Rifampicin (gelb) sowie Ertapenem und Fosfomycin (grün). Abbildung selbst erstellt,

Eine Selektion Rifampicin-resistenter Klone wurde überwiegend nicht beobachtet (Abbildung 12). Lediglich bei *E. coli* NRZ14408 konnten zu Versuchsbeginn Rifampicin-resistente Klone nachgewiesen werden (zwischen 15,9 und 22,5%). Der Anteil fiel unter der Therapie mit Rifampicin auf 1% und unter der Kombinationstherapie aus Ertapenem und Rifampicin unterhalb die Nachweisgrenze ab.

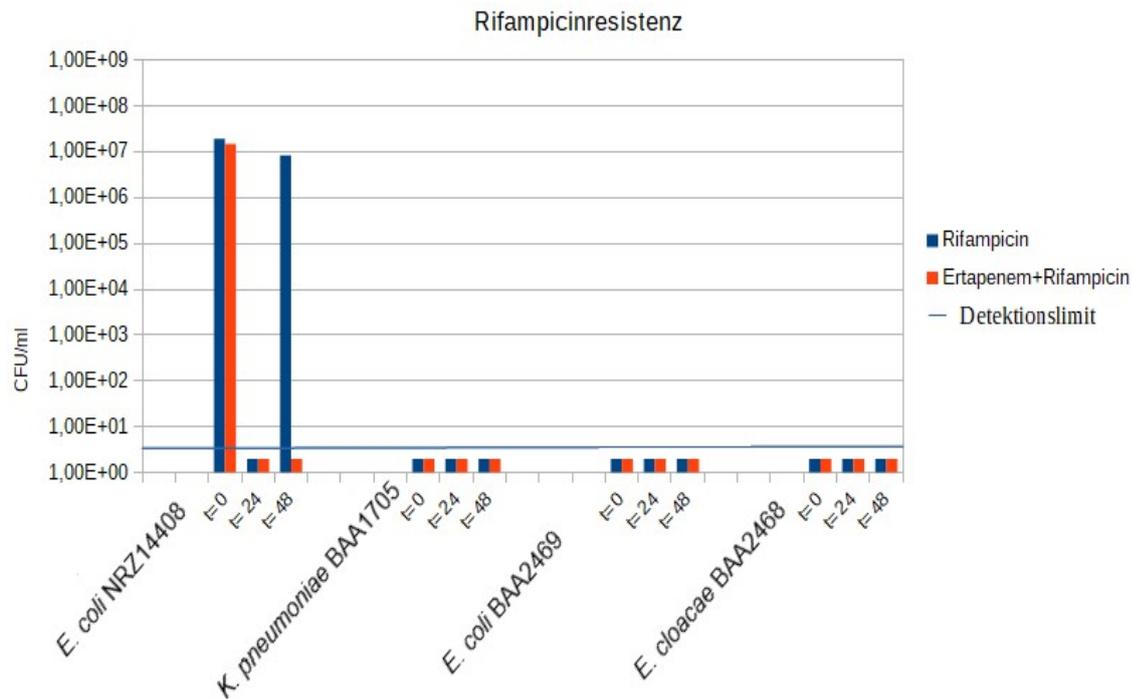


Abbildung 12: Rifampicin-resistente Klone in CFU/ml nach 0, 24 und 48 Stunden für die vier untersuchten Bakterienstämme unter Therapie mit Rifampicin (blau) sowie Ertapenem und Rifampicin (rot). Abbildung selbst erstellt.

Die Kombination von Fosfomycin und Ertapenem konnte bei allen untersuchten Stämmen die Selektion Fosfomycin- und auch Ertapenem-resistenter Klone verhindern. Einzig im Fall von *K. pneumoniae* BAA1705 führte die alleinige Therapie mit Fosfomycin über den Versuchszeitraum zu einem erhöhten Anteil Fosfomycin-resistenter Klone (1,7% zu Versuchsbeginn und 4,08% nach 48 Stunden, Abbildung 13) Dies konnte durch die Kombinationstherapie aus Ertapenem und Fosfomycin verhindert werden. Hier betrug der Anteil Fosfomycin-resistenter Klone zu Versuchsbeginn 0,7%, nach 48 Stunden lag die Anzahl resistenter Kolonien unter dem Detektionslimit.

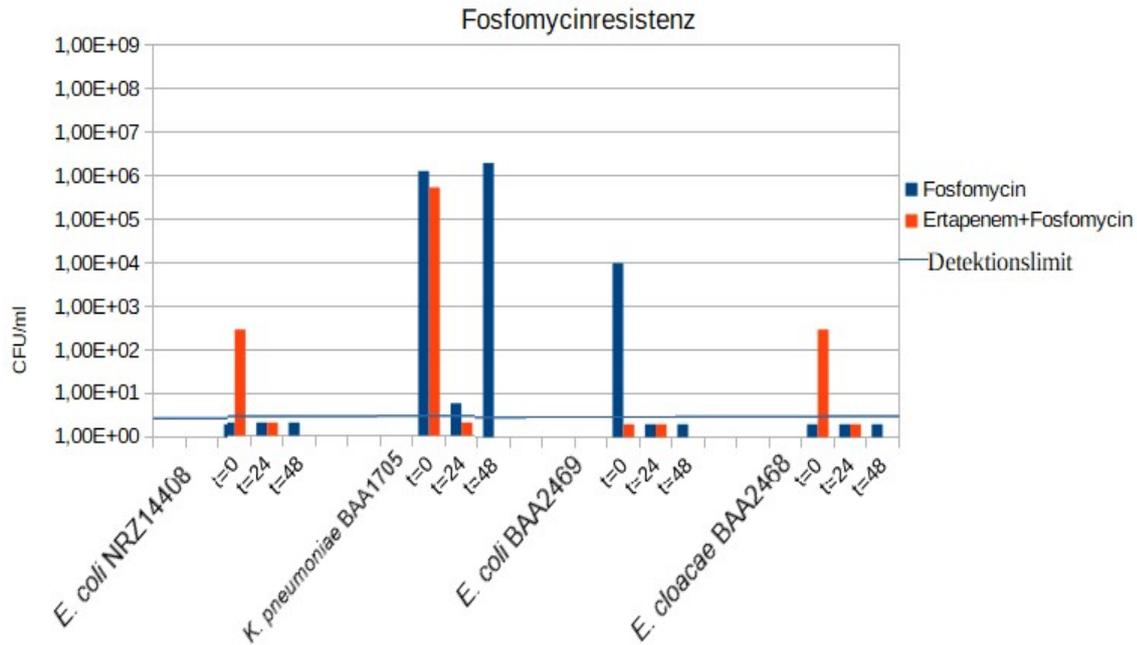


Abbildung 13: Fosfomycin-resistente Klone in CFU/ml nach 0, 24 und 48 Stunden für die vier untersuchten Bakterienstämme unter Therapie mit Fosfomycin (blau) sowie Ertapenem und Fosfomycin (rot). Abbildung selbst erstellt.

Die Kombinationstherapie aus Ertapenem und einem Vertreter einer weiteren Gruppe wirkt sich also nicht nur positiv auf die Entstehung von Ertapenemresistenzen aus, sondern kann auch die Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Kombinationspartner vorbeugen. Die Selektion Levofloxacin-resistenter Bakterien konnte weder in den Versuchen mit Levofloxacin allein noch in den Versuchen mit Levofloxacin als Kombinationspartner beobachtet werden (Abbildung 14). Dies war trotz eines erneuten Wachstums der Bakterien im Blasenmodell der Fall.

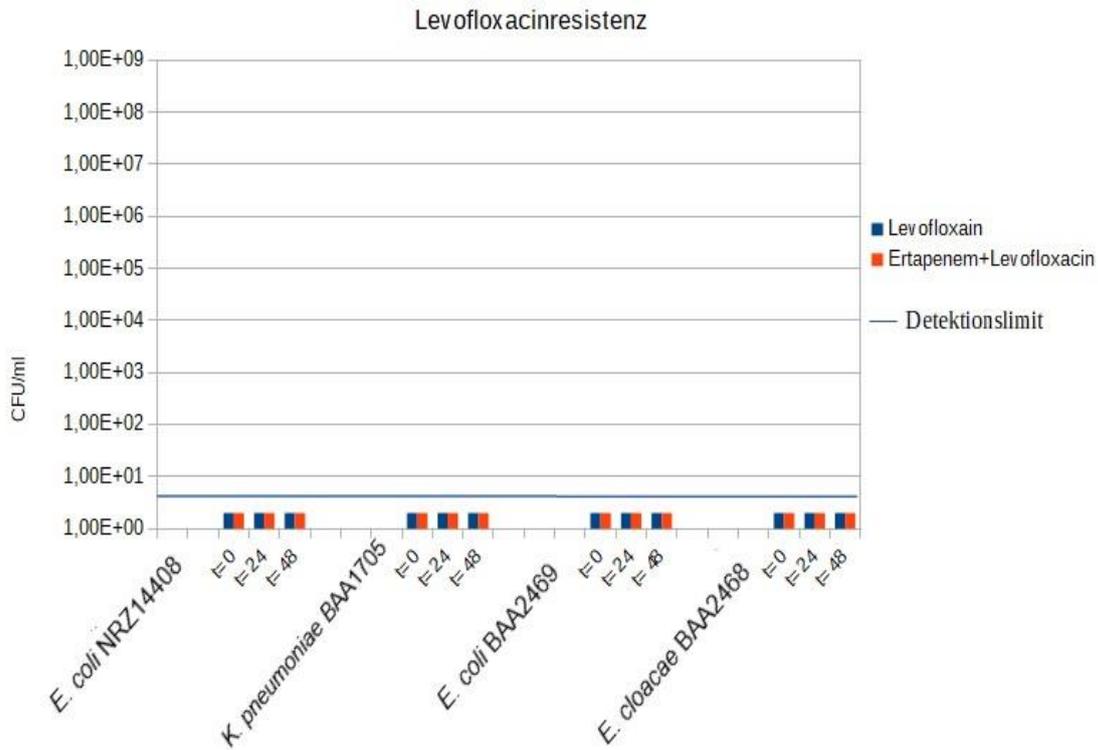


Abbildung 14: Levofloxacin-resistente Klone in CFU/ml nach 0, 24 und 48 Stunden für die vier untersuchten Bakterienstämme unter Therapie mit Levofloxacin (blau) sowie Ertapenem und Levofloxacin (rot). Abbildung selbst erstellt.

4. Diskussion

Antibiotikaresistenzen könnten bis 2050 für 10 Millionen Todesfälle weltweit pro Jahr verantwortlich sein und damit Krebs als häufige Todesursache überholen (Band et al. 2019). Aufgrund fehlender neuer antibiotisch wirksamer Substanzen müssen die vorhandenen Therapiemöglichkeiten optimiert werden (Band et al. 2019). In der Vergangenheit zeigten sich vor allem Kombinationstherapien zur Bekämpfung von CRE als vielversprechend. Auch Antibiotika, welche in der Einzeltherapie nicht effektiv sind, konnten in der Kombinationstherapie erfolgreich eingesetzt werden (Band et al. 2019). Daher untersuchten wir in dieser Arbeit die Kombination eines Carbapenems mit einem Vertreter einer weiteren Antibiotikagruppe. Zur besseren Übertragbarkeit auf die Situation in vivo erfolgte die Untersuchung im dynamischen Blasen-Modell.

4.1 MIC-Bestimmung

Wie erwartet waren die drei Carbapenem-sensiblen Stämme sensibel auf alle eingesetzten Antibiotika. Bei den sechs Carbapenem-resistenten Stämmen war auffällig, dass neben der zu erwartenden Carbapenem-Resistenz auch eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und dem Aminoglykosid Tobramycin auftrat. Dies entspricht der kürzlich vom ECDC (European Center of Disease Prevention and Control) veröffentlichten Warnung, dass eine steigende Zahl Carbapenem-resistenter *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämme ebenfalls Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen und Aminoglykosiden zeigten (ECDC 2017). Der 2017 von der ECDC veröffentlichte Bericht fügt sich nahtlos in die Reihe besorgniserregender Berichte über wachsende Antibiotikaresistenzen ein. In unseren Versuchen zeigten sich außerdem erhöhte MIC-Werte der Carbapenem-resistenten Bakterienstämme bezüglich Nitrofurantoin. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Nitrofurantoin in Carbapenem-resistenten Bakterienstämmen ist besonders alarmierend, da Nitrofurantoin neben Carbapenemen und Colistin zuletzt wieder häufiger zur Therapie multiresistenter Erreger eingesetzt wurde (Zavascki et al. 2013).

Es fiel außerdem eine erniedrigte Aktivität von Fluorchinolonen, Tobramycin und Tigecyclin in AU verglichen mit CAMHB auf. Loose et al. konnten die pH-abhängige Aktivität von Tobramycin in Urin bereits nachweisen. Dies wurde auf eine verminderte Aufnahme von Tobramycin aufgrund der fehlenden chemiosmotischen Kopplung unter sauren Bedingungen zurückgeführt (Loose et al. 2018). Die erniedrigte Aktivität von Fluorchinolonen in AU wurde außerdem von Dalhoff et al. beschrieben (Dalhoff et al. 2011). Dies wurde zurückgeführt auf den sauren pH und die erhöhte Konzentration von Kationen im AU verglichen mit CAMHB (Marshall und Piddock 1994). Da Tigecyclin in niedrigerem pH anfälliger für nichtenzymatische Epimerisierung ist, ließe sich hiermit die erniedrigte Aktivität in AU erklären (Jitkova et al. 2014). Daraus muss allerdings unbedingt auch geschlossen werden, dass das Übertragen von Versuchsergebnissen aus Versuchen, welche in gängigen Medien wie CAMHB durchgeführt wurden, auf die Situation im menschlichen Körper nicht immer möglich ist. Wenn möglich, sollten die Versuche unter möglichst ähnlichen Bedingungen und in möglichst ähnlichen Medien durchgeführt werden, da die Ergebnisse sich unterscheiden können. Dies konnte auch mit dieser Arbeit erneut gezeigt werden.

In den Versuchen zur Bestimmung der MIC-Werte zeigten Carbapeneme in AU eine erhöhte Aktivität, verglichen mit den Werten in CAMHB. Dies kann auf eine erhöhte Bindungsaffinität von Carbapenemen an Penicillin-Bindungs-Proteine bei niedrigem pH

zurückgeführt werden (Lemaire 2007) und zeigt wiederum die Notwendigkeit, Versuche im passenden Medium durchzuführen.

Der *mcr-1*-positive, Colistin-resistente Stamm *E. coli* NRZ14408 zeigte erhöhte MIC-Werte für Colistin in AU verglichen mit CAMHB sowie erhöhte MIC-Werte für Rifampicin verglichen mit den anderen Stämmen in beiden Medien. Dies bestätigt Loose et al., die kürzlich zeigen konnten, dass die *mcr-1* vermittelte Colistinresistenz in AU aufgrund des erniedrigten pH im Vergleich zu CAMHB deutlich erhöht ist (Loose et al. 2019a).

Aussagen, die in Forschung und Klinik über die Wirksamkeit eines Antibiotikums getroffen werden, beruhen häufig allein auf Untersuchungen der Pharmakokinetik und -dynamik in CAMHB. Die gefundenen Parameter zur Aktivität des Antibiotikums sind unter physiologischen Bedingungen nicht selten signifikant schlechter. Daher ist es wichtig, wie auch in dieser Arbeit erfolgt, Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im passenden Medium - in unserem Falle AU, gegebenenfalls auch Serum oder Plasma - durchzuführen.

4.2 Checkerboard-Assays

Es konnte in der Kombinationstestung für die Carbapenem-sensiblen Stämme in CAMHB kein Vorteil gegenüber der Einzelantibiotikatherapie festgestellt werden. In AU zeigte sich eine leichte Überlegenheit. Hier zeigt sich erneut, dass *in vitro* Versuche möglichst in einem Medium durchgeführt werden sollten, welches dem späteren Zielmedium der getesteten Substanz in Zusammensetzung, pH-Wert, Ladung und Verhalten möglichst nahekommt. Gleichzeitig lässt sich an diesem Ergebnis festmachen, dass die Kombinationstherapie bei sensiblen Erregern zwar keine größeren Vorteile bringt, gleichzeitig aber auch keine Nachteile bewirkt. Dies ließe den Einsatz der Kombinationstherapie auch bei nicht vorliegender Resistenztestung des Erregers zu. Dies dürfte nur in außerordentlichen Ausnahmefällen, wie beispielsweise bei begründetem Verdacht auf das Vorliegen eines Carbapenem-resistenten Erregers oder bei akut lebensbedrohlichen Krankheitsbildern, erfolgen, da der ungezielte und übermäßige Einsatz von Antibiotika einerseits mit Nebenwirkungen und andererseits mit der Entstehung von Resistenzen verbunden ist. Allein Fosfomycin konnte auch im Fall der Carbapenem-sensiblen Stämme eine deutliche Reduktion der MIC-Werte bewirken. Dies spricht bei fehlender Resistenztestung und akutem Handlungsbedarf für den Einsatz von Fosfomycin als Kombinationspartner des Carbapenems. Der Einsatz der Kombinationstherapie sollte dennoch keinesfalls routinemäßig erfolgen.

Vielversprechende, synergistische Kombinationen in Bezug auf die Carbapenem-resistenten Stämme waren die Kombination eines Carbapenems mit Levofloxacin,

Colistin, Fosfomycin und Rifampicin. Es fand sich hier nur bei Levofloxacin ein Unterschied bezüglich den Ergebnissen in AU und CAMHB. Die Wirksamkeit der Kombination aus Meropenem und Levofloxacin war in AU deutlich abgeschwächt. In der Einzeltestung war die Wirksamkeit von Meropenem in AU verbessert, die von Levofloxacin abgeschwächt. Wie bereits 2017 von Dalhoff et al. beobachtet, ist die Wirksamkeit von Fluorchinolonen in AU abgeschwächt (Dalhoff et al. 2017). Dieser Effekt schien in der Kombinationstestung die erhöhte Aktivität von Meropenem zu überwiegen.

Vergleicht man die Ergebnisse für Meropenem und Ertapenem als Vertreter der Carbapeneme in der Kombinationstherapie, schneidet Ertapenem minimal besser ab. Darüber hinaus besitzt Ertapenem mit 4 Stunden eine längere Halbwertszeit als Meropenem und eignet sich daher für die Gabe einmal täglich. Es sind aufgrund fehlender Interaktion mit dem Cytochrom P450-System kaum Arzneimittelinteraktionen beschrieben und neben einer intravenösen Gabe ist auch die intramuskuläre Applikation möglich. Ertapenem wurde 2001 zugelassen, Meropenem bereits 1996. Daher sind im Fall von Ertapenem weniger Resistenzen zu erwarten (Shah und Isaacs 2003). Aus diesen Gründen sollte Ertapenem in der Kombinationstherapie bevorzugt eingesetzt werden. Da Meropenem aber ähnlich gut wirksam ist, kann, falls Ertapenem nicht verfügbar sein sollte, auch auf Meropenem zurückgegriffen werden. Außerdem sollte im Fall von nosokomialen Infektionen bevorzugt Meropenem eingesetzt werden, da Ertapenem nur schlecht gegen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* wirksam ist (Shah und Isaacs 2003). Zu beachten ist außerdem, dass Ertapenem in Europa bisher nicht für die Behandlung von Harnwegsinfektionen zugelassen ist (Sk2 Leitlinie 2018).

4.3 Dynamisches Blasen-Modell

Wijma et al. beschrieben kürzlich eine wesentliche Diskrepanz zwischen in der Klinik beobachteter Effektivität von Antibiotikatherapien und deren Effektivität *in vitro* (Wijma et al. 2019). Daraus ergibt sich die Wichtigkeit dynamischer Modelle in möglichst physiologischen Medien, die die Gegebenheiten im menschlichen Körper möglichst gut wiedergeben können. Die Untersuchung von Pharmakodynamik und Pharmakokinetik in dynamischen Modellen kann eine bessere Vorhersage über die Effektivität von Pharmakologika *in vivo* ermöglichen.

So zeigte sich in unseren Versuchen in der Antibiotikaeinzeltherapie ein erneutes Wachstum der Bakterienstämme nach spätestens 24 Stunden, obwohl die Antibiotikakonzentration für mindestens 20 Stunden oberhalb der zuvor bestimmten MIC-Werte lag. Dies widerspricht den Angaben in der Literatur, dass eine

Carbapenemkonzentration über der MIC für über 40% des Dosierungsintervalls für einen bakteriziden Effekt ausreichend sei (Drusano 2003). Dies zeigt die Unzuverlässigkeit literarischer Angaben, welche aus Versuchen mit klassischem Aufbau in klassischen Medien (CAMHB) stammen.

Die in der Kombinationstestung eingesetzten Kombinationspartner für Ertapenem waren Rifampicin, Levofloxacin und Fosfomycin.

Die tatsächlichen Konzentrationen der Antibiotika im Blasen-Modell lagen leicht unterhalb der angestrebten Konzentrationen. Dennoch konnte mit einer effektiv niedrigeren Dosis in den meisten Fällen ein ausreichender bakterizider Effekt erzielt werden. Dies könnte für die Praxis eine mögliche Dosisreduktion bedeuten. Können die synergistisch wirksamen Antibiotika auch in einer niedrigeren Dosis angewendet werden, sollte dies zu weniger unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Dosisabhängige Nebenwirkungen von Ertapenem sind beispielsweise Nierenschädigung und Krampfanfälle (Shah und Isaacs 2003). Unter der Therapie mit Fosfomycin kommt es bei höheren Dosen häufiger zu gastrointestinalen Nebenwirkungen und Leberschädigung (Iarikov et al. 2015). Auch Rifampicin wirkt dosisabhängig hepatotoxisch (Grosset und Leventis 1983). Diese Nebenwirkungen würden bei niedrigeren Dosen seltener auftreten. Außerdem ist der Einsatz niedrigerer Dosen auch bei Niereninsuffizienz oder Lebererkrankungen möglich. Ob diese Ergebnisse auf die Situation in vivo übertragbar sind, muss in klinischen Studien zukünftig noch gezeigt werden, vor allem da niedrigere Dosen häufig mit einem erhöhten Entstehen von Resistenzen verbunden sind (Raymond 2019). Vor allem Fosfomycin ist bei niedrigeren Konzentrationen häufig von einer Resistenzentwicklung betroffen (Samonis et al. 2012). Im Umkehrschluss ist es möglich, dass noch bessere Ergebnisse erzielt werden würden, wenn die tatsächlich angestrebte Konzentration erreicht werden würde (Kaushik et al. 2015).

Da die Resistenzraten von CRE gegenüber Fluorchinolonen erhöht sind und aufgrund der etwas reduzierten Aktivität von Levofloxacin in AU, scheinen Rifampicin und Fosfomycin trotz ähnlich guter Ergebnisse im Blasen-Modell Levofloxacin überlegen zu sein und sollten als Kombinationspartner von Ertapenem präferiert werden. Des Weiteren sollte der Einsatz von Fluorchinolonen aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen wie Sehnenrupturen, Seh- und Hörstörungen sowie Herzrhythmusstörungen und Aortenaneurysmen ohnehin nur bei zwingend gegebener Indikation erfolgen (Richards et al. 2019). Da Fosfomycin Rifampicin in der Anwendung auf Carbapenem-sensible Stämme überlegen war und auch bei den Carbapenem-resistenten Stämmen als einziger Kombinationspartner bei allen untersuchten Stämmen wirksam war, kann die größte Empfehlung für Fosfomycin ausgesprochen werden.

Betrachtet man die Ergebnisse im Blasen-Modell unter dem Gesichtspunkt der verschiedenen Resistenzmechanismen der untersuchten Bakterienstämme, können einige Auffälligkeiten beobachtet werden. Im Blasen-Modell untersucht wurden zwei Bakterienstämme mit dem Gen für die Klasse B Carbapenemase NDM-1 (*E. coli* BAA2469, *E. cloacae* BAA2468) sowie zwei Stämme mit dem Gen für die Klasse A Carbapenemase KPC (*K. pneumoniae* BAA1705, *E. coli* NRZ14408). Alle untersuchten Bakterienstämme gehören zu den *Enterobacteriaceae*, welche bezüglich aufkommender Multiresistenzen eine der problematischsten Spezies bildet (Raymond 2019). Auffällig war, dass im Falle der Bakterienstämme mit NDM-1 bereits ein Antibiotikum in der Einzeltestung ausreichend war, um einen ausreichenden bakteriziden Effekt zu erzielen. Fosfomycin war ausreichend für die Abtötung von *E. coli* BAA2469, während *E. cloacae* BAA2468 unter Levofloxacin allein abgetötet werden konnte. Weiterhin zeigte sich für die NDM-1-Stämme eine im Vergleich zu den KPC-Stämmen geringere Effektivität der Kombinationstherapie aus Ertapenem und Levofloxacin. Beide zeigten ein erneutes Wachstum unter dieser Kombination nach etwa 7 Stunden. *E. coli* BAA2469 konnte erst nach 48 Stunden vollständig abgetötet werden, während *E. cloacae* BAA2468 über den gesamten Beobachtungszeitraum weiteres Wachstum zeigte. *E. cloacae* BAA2468 zeigte außerdem auch unter der Kombination aus Ertapenem und Rifampicin ein erneutes Wachstum nach 24 Stunden. In der Analyse der Resistenzentwicklung war vor allem auffällig, dass es insgesamt im Falle aller untersuchten Antibiotika bei *E. cloacae* BAA2468 häufiger zu einer Selektion resistenter Klone kam. Aus diesen beobachteten Unterschieden zwischen den NDM-1- und KPC-Stämmen lässt sich schließen, dass NDM-1 zumindest in Bezug auf die von uns untersuchte Kombinationstherapie die problematischere Resistenz darstellt. Grund hierfür könnte sein, dass NDM allgemein Carbapeneme schneller hydrolysiert als KPC (Rosa et al. 2018). Daher sollte vor allem in Regionen, in denen NDM-1 verbreitet ist, primär die wirksamere Kombination aus Ertapenem und Fosfomycin eingesetzt werden.

Betrachtet man die verschiedenen Wirkmechanismen der in der Kombinationstherapie eingesetzten Antibiotika, würde man vor allem von an unterschiedlichen Bakterienstrukturen ansetzenden Wirkstoffen einen Synergismus erwarten. Eine Mutation in einem einzelnen Gen würde dann auch nicht ausreichen, um die Bakterienzelle gegen die Therapie resistent zu machen (Tyers und Wright 2019).

Levofloxacin hemmt als Fluorchinolon die Bakteriengyrase und damit die Transkription der DNA, während Carbapeneme als Betalaktamantibiotika in die Zellwandsynthese eingreifen. Durch Hemmung der Transkription durch Levofloxacin könnte der Reparaturmechanismus der Zellwand durch das Fehlen der dafür nötigen Proteine gestört sein. Dies könnte den Synergismus zwischen Ertapenem und Levofloxacin

erklären. Hosgor-Limoncu et al. (2018) konnten diesen Synergismus kürzlich in Time-Kill-Assays ebenfalls nachweisen. Untersucht wurden hier allerdings keine CRE, sondern ESBL-produzierende *Acinetobacter* und *Klebsiella* sowie *Pseudomonas* und *E.coli*. Levofloxacin und Ertapenem zeigten hier für *Acinetobacter* und *Pseudomonas* einen Synergismus, während Hosgor-Limoncu et al. für die Anwendung auf *E. coli* einen Antagonismus postulierten (Hosgor-Limoncu et al. 2008). Diese Arbeit hat mit der vorliegenden Arbeit gemein, dass ein Synergismus für die Kombination aus Ertapenem und Levofloxacin festgestellt werden konnte. Es zeigte sich in der Arbeit von Hosgor-Limoncu et al. im Fall von *E.coli* allerdings kein Synergismus, was von unseren Ergebnissen abweicht. Mit den genutzten Time-Kill-Assays wurde von Hosgor-Limoncu et al. allerdings ein starres Modell genutzt, dessen Ergebnisse nur schwer auf die Situation in vivo übertragbar sind. Außerdem unterschieden sich die Resistenzmechanismen der untersuchten Bakterien. Ertapenem besitzt gegenüber *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Enterokokken* eine schlechte Aktivität, welche durch die Kombination allerdings verbessert werden konnte. Vorteile von Levofloxacin als Kombinationspartner sind die Möglichkeit der oralen Applikation sowie die geringere Nephrotoxizität (Drago et al. 2005). Auch Joly-Guillou et al. (2000) konnten in ihrer Arbeit den synergistischen Effekt zwischen Ertapenem und Levofloxacin zeigen. Die Versuche wurden hier in vivo an einem Pneumonie-Maus-Modell durchgeführt und *Acinetobacter baumannii* untersucht. Die Kombination konnte die Mortalität deutlich senken und führte nicht zu vermehrten Resistenzen (Joly-Guillou et al. 2000). Auch die von uns erfolgreich eingesetzte Kombination aus Ertapenem und Rifampicin wurde bereits mehrfach untersucht. Kaushik et al. konnten einen Synergismus zwischen Carbapenemen und Rifampicin gegenüber Mykobakterien zeigen. Es wurden außerdem unter der Kombinationstherapie weniger Resistenzen beobachtet (Kaushik et al. 2015). Zu einem gegenteiligen Ergebnis kommen Saballs et al., welche vielversprechende in vitro Versuche mit der Kombination aus Imipenem und Rifampicin in klinischen Versuchen testeten. Es kam hier zum Therapieversagen, welches in einigen Fällen im Tod der Patient*innen resultierte. Untersucht wurden Infektionen mit *Acinetobacter baumannii* (Saballs et al. 2006). Die Ergebnisse sind also erneut nicht gut vergleichbar, da in der vorliegenden Arbeit CRE untersucht wurden und Ertapenem als Vertreter der Carbapeneme eingesetzt wurde. Es lässt sich daher aus den schlechten in vivo Ergebnissen von Saballs et al. noch nicht schließen, dass die von uns als vielversprechend bewertete Kombination aus Ertapenem und Rifampicin in vivo nicht erfolgreich sein könnte. Bei der Verwendung von Rifampicin sollte beachtet werden, dass es sich um einen starken Induktor des Cytochrom-P450-Systems handelt und es daher

zu zahlreichen Interaktionen mit anderen Medikamenten kommen kann (Sk2 Leitlinie 2018).

Bezüglich der von uns als am sichersten und effektivsten betrachteten Kombination aus Ertapenem und Fosfomycin liegen in der Literatur einige Arbeiten zum Vergleich vor. Fosfomycin ist außerdem in der Therapie von HWI sehr gut erprobt. Unter der Monotherapie mit Fosfomycin kommt es allerdings gehäuft zur Resistenzbildung (Souli et al. 2011), weshalb sich Fosfomycin vor allem in der Therapie von komplizierten HWI nur als Kombinationspartner eignet. Yu et al. untersuchten 2017 die Effektivität von Kombinationen mit Fosfomycin gegenüber KPC-produzierender *K. pneumoniae* mittels Checkerboard und Time-Kill-Assays. Der größte synergistische Effekt konnte in der Kombination von Fosfomycin mit einem Carbapenem, Imipenem oder Ertapenem, festgestellt werden (Yu et al. 2017). Diese Befunde werden von den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt und da die Kombination von Fosfomycin und Ertapenem auch im Blasen-Modell besonders effektiv war, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Kombinationstherapie auch in der Klinik nützlich sein kann. Der synergistische Effekt der Kombination kann dadurch erklärt werden, dass Fosfomycin die äußere Zellmembran der Bakterien penetriert und damit ein besseres Eindringen anderer Wirkstoffe ermöglichen kann. Fosfomycin verhindert die Bildung von Peptidoglykanketten in der bakteriellen Zellwand (Yu et al. 2017). Da Carbapeneme ebenfalls durch Hemmung der Zellwandsynthese wirksam sind, könnte sich dieser Effekt potenzieren. Darüber hinaus könnte Fosfomycin das Expressionsmuster der PBPs modifizieren und dadurch die Bindung der Carbapeneme an die PBPs verstärken (Samonis et al. 2012). Auch Souli et al. untersuchten den Effekt einer Fosfomycin-enthaltenden Kombinationstherapie auf KPC-produzierende *K. pneumoniae* mittels Time-Kill-Assays in CAMHB. Das eingesetzte Carbapenem war hier allerdings Meropenem. Sie konnten in über 64% einen synergistischen Effekt mit verbessertem bakterizidem Effekt zwischen Meropenem und Fosfomycin zeigen. Außerdem wurde keine erhöhte Resistenzentwicklung beobachtet (Souli et al. 2011). Der positive Effekt einer Kombination aus Fosfomycin und einem Carbapenem konnte mittels Etest auch von Samonis et al. gezeigt werden, allerdings wurden hier ESBL-produzierende Bakterien untersucht (Samonis et al. 2012). Da die Kombination aus einem Carbapenem und Fosfomycin in vitro gut untersucht ist und verschiedene Arbeiten den Synergismus der Kombination zeigen konnten, ist es nicht überraschend, dass diese auch bereits in der Klinik Anwendung gefunden hat. Rosa et al. therapierten mit der Kombination aus zwei Carbapenemen und Fosfomycin erfolgreich zwei Patienten, welche an einer HWI mit einem NDM-produzierenden Bakterium litten. Fosfomycin wurde hier jeweils aufgrund seiner geringen Nephrotoxizität ausgewählt (Rosa et al. 2018). Zu beachten sind jedoch die Nebenwirkungen auf den

Natrium- und Kaliumhaushalt (Sk2 Leitlinie 2018). Auch Seija et al. therapierten eine auf dem Boden einer HWI entstandene Sepsis, ausgelöst durch NDM-produzierende *Morganella morganii*, erfolgreich mittels einer Kombination aus Fosfomycin und Meropenem (Seija et al. 2015). Der erfolgreiche Einsatz der Kombinationstherapie aus einem Carbapenem und Fosfomycin in der Praxis unterstreicht unsere Ergebnisse noch weiter und verstärkt unsere Empfehlung vor allem für Fosfomycin als Kombinationspartner für Ertapenem. Alle genannten in vitro Studien nutzten Time-Kill-Assays oder Checkerboards in CAMHB. An ihnen ist also zu kritisieren, dass eine Übertragung der Ergebnisse in vivo nur begrenzt möglich ist. Sie sind außerdem nur schwer zu vergleichen, da beispielsweise unterschiedliche Erreger mit verschiedenen Resistenzmechanismen untersucht wurden. Im Unterschied dazu sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch ein Blasen-Modell, welches ermöglicht, die physiologische Pharmakodynamik und -kinetik zu simulieren, besser auf die Situation in vivo übertragbar als starre Versuchsmodelle.

Obwohl die getesteten *E. coli*- und *E. cloacae*-Stämme für die Kombinationen mit Levofloxacin und Rifampicin in den Checkerboard Assays ähnliche Ergebnisse zeigten, konnte dies im dynamischen Blasen-Modell nicht bestätigt werden. Kritisch anzumerken bleibt, dass die Versuche im Blasen-Modell nicht ausreichend häufig durchgeführt worden sind und die Aussagekraft daher eingeschränkt ist. Dennoch bestätigt die Diskrepanz der Ergebnisse in den Checkerboard Assays und dem dynamischen Blasen Modell die Aussagen von Wijma et al., dass bei in vitro Versuchen zusätzlich zu statischen Versuchen dynamische Modelle in den Versuchsaufbau mit einbezogen werden sollten, um die Aussagekraft und den Vorhersagewert auf die Situation in vivo zu verstärken.

Aktuell sind Colistin-enthaltende Kombinationstherapien Regime der Wahl zur Behandlung Carbapenem-resistenter Gram-negativer Erreger. Auf Basis der verfügbaren Studiendaten ist jedoch keine fundierte Empfehlung dieses Therapieregimes möglich. Darüber hinaus schränkt die Nephrotoxizität die Einsatzmöglichkeiten von Colistin stark ein, wobei diese Nebenwirkungen zuletzt seltener beobachtet wurden (Sk2 Leitlinie 2018). Eine inadäquate Therapie mit Colistin führt außerdem häufig zu Resistenzen und damit zur Selektion weiterer resistenter Erreger (Dickstein et al. 2019). Daher wurde, obwohl die Kombination mit Colistin in den Checkerboard Assays vielversprechend erschien, dieser Ansatz im Blasen-Modell nicht weiter verfolgt und Levofloxacin, Rifampicin sowie Fosfomycin vorgezogen.

In der Resistenzanalyse zeigte sich bezüglich einer Ertapenemresistenz lediglich bei *E. cloacae* BAA2468 eine vermehrte Selektion resistenter Keime, sowohl unter der Kombinationstherapie von Ertapenem mit Levofloxacin als auch mit Rifampicin. Eine

erhöhte Selektion von Rifampicin-resistenten Klonen wurde nicht beobachtet. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (Kaushik et al. 2015; Joly-Guillou et al. 2000).

Eine Untersuchung bezüglich Klonalität der Bakterien oder Heteroresistenz wurde nicht durchgeführt. Über 88 % der CRE exprimieren Heteroresistenz. Band et al. konnten zeigen, dass Antibiotikakombinationen, welche auf diese Heteroresistenzen abzielten, eine bessere Effektivität erreichen konnten als Kombinationen, welche nur auf eine homogene Resistenz ausgerichtet waren (Band et al. 2019). Eine weitere Analyse der resistenten Bakteriensubpopulationen bezüglich Heteroresistenz hätte in unserer Arbeit darüber Auskunft geben können, ob die besonders effizienten Antibiotikakombinationen auf mögliche vorhandene Heteroresistenzen abzielten.

Häufige Kritik an in vitro-Ansätzen ist die mangelnde Übertragbarkeit auf die Situation in vivo sowie die fehlende Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien aufgrund unterschiedlicher Versuchsmethoden (Tzouveleakis et al. 2014). Zielführend wäre daher, ein einheitliches Vorgehen für Studien zur Untersuchung von Antibiotikakombinationen zu etablieren. Dazu müssten nicht nur die Versuchsmethoden vereinheitlicht werden, sondern auch eine Möglichkeit gefunden werden, die MIC-Werte zu vergleichen (Tzouveleakis et al. 2014). Die Kritik der fehlenden Übertragbarkeit auf die Situation in vivo versucht diese Arbeit durch den Einsatz eines dynamischen Blasen-Modells mit dem Einsatz von AU auszugleichen, welche eine bessere Aussagekraft der erhaltenen Daten zu Pharmakodynamik und -kinetik gewährleisten sollte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der Synergismus von Ertapenem und Levofloxacin, Rifampicin und Fosfomycin sowie die Wirksamkeit dieser Kombinationstherapien in einem dynamischen Blasen-Modell gezeigt werden. Aufgrund oben beschriebener Gründe kann die höchste Empfehlung für Rifampicin und besonders für Fosfomycin ausgesprochen werden. Lokale Resistenzraten und individuelle patient*innenbezogene Gegebenheiten sollten beachtet werden. Der Einsatz der Kombinationstherapie am Menschen wäre ohne vorherige Tierstudien oder Zulassungsverfahren möglich, da Nebenwirkungen und abgedecktes Erregerspektrum der Antibiotika bereits bekannt sind und die Medikamente für die Anwendung am Menschen zugelassen sind. Weitere klinische Studien, um die Wirksamkeit in vivo zu bestätigen, müssen zukünftig durchgeführt werden. Darin könnte beispielsweise auch untersucht werden, ob die Verabreichung einer Einzeldosis, wie in dieser Arbeit erfolgt, in vivo einen ausreichenden bakteriziden Effekt erzielen kann oder ob mehrere Gaben erforderlich sind. Sollte wie in unseren Versuchen, eine Einzeldosis ausreichend sein, könnte dies die Handhabung der Therapie für Patient*innen und Behandelnde stark erleichtern. Durch die Kombination eines Carbapenems mit Rifampicin oder Fosfomycin

könnten die Therapie verbessert und schwerwiegende Verläufe mit lebensbedrohlichen Komplikationen vermieden werden. Außerdem könnte eine feste Kombination der Medikamente in einer Tablette insbesondere bei Polypharmazie die Compliance verbessern. Ist die Anwendung in einer gemeinsamen Infusion möglich, kann dies die Arbeit der Pflegenden und Ärzt*innen erleichtern. Zuletzt häuften sich die Empfehlungen, hoch dosierte, Carbapenem-enthaltende Kombinationstherapien zur Therapie von CRE einzusetzen. Weitere Studien müssen deren Effektivität weiter beweisen. Hierzu sollten, wie in dieser Arbeit erfolgt, dynamische Modelle zum Einsatz kommen und der tatsächliche Wirkort des Antibiotikums in vivo bei der Auswahl des Versuchsmediums beachtet werden. Eine weitere Untersuchung im Tiermodell oder klinischen Studien sollte weiterhin erfolgen. Die vorliegenden Ergebnisse könnten allerdings bereits jetzt Kliniker*innen als Entscheidungshilfe in der Therapie von durch CRE verursachten Infektionen dienen.

5. Zusammenfassung

Antibiotikaresistenzen sind weltweit auf dem Vormarsch und stellen eine große Bedrohung für die Gesundheitssysteme dar. Die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen lässt auf sich warten und es müssen daher Wege gefunden werden, die vorhandenen Antibiotika optimal zur Therapie zu nutzen. Harnwegsinfektionen (HWI) verursachen sowohl im ambulanten als auch im stationären Bereich eine Vielzahl von Antibiotikaverschreibungen und tragen damit ebenfalls zur Entstehung weiterer Resistenzen bei. *Enterobacteriaceae*, welche häufig Ursache von Harnwegsinfektionen sind, zeigten zuletzt besonders problematische Resistenzen. Die häufig letzte wirksame Behandlungsstrategie bilden Carbapeneme, welche aber durch die weltweite Ausbreitung Carbapenemase-produzierender und damit Carbapenem-resistenter Bakterien, darunter vor allem *Enterobacteriaceae*, bedroht sind. Es fehlen kontrollierte randomisierte Studien, um im Falle von Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae* (CRE) eine fundierte Therapieempfehlung abgeben zu können. Es häufen sich allerdings die Hinweise darauf, dass Carbapenem enthaltende Kombinationstherapien die höchste Effektivität gegen CRE besitzen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, CRE durch die Verwendung von Carbapenem enthaltenden Antibiotikakombinationen zu eradizieren. Untersucht wurden 4 Carbapenemase-produzierende Bakterienstämme, darunter 2 NDM-produzierende und 2 KPC-produzierende Stämme. Es wurde die Anwendung der Kombinationstherapie in einem dynamischen Blasen-Modell und damit die Anwendung auf HWI untersucht.

Es erfolgte zunächst die Bestimmung der minimalen inhibitorischen (MIC) und bakteriziden Konzentration in artifiziellem Urin (AU) und Kationen-adjustiertem Müller-Hinton Medium (CAMHB). Mit Hilfe der gefundenen MIC erfolgte die Kombinationstestung von Meropenem oder Ertapenem als Vertreter der Carbapeneme gemeinsam mit 8 weiteren Antibiotika in Checkerboard-Assays. Auch diese wurden in CAMHB und AU durchgeführt. Die Antibiotikakombinationen, welche in den Checkerboard-Assays die wirksamste MIC-Reduktion in Anwendung auf die meisten Bakterienstämme zeigten, wurden anschließend in einem dynamischen Blasen-Modell weiter untersucht. Hier erfolgte die Simulation der physiologischen Pharmakodynamik und -kinetik unter einer durchschnittlichen Urinproduktion von 1,5 Litern pro Tag und Entleerung der Blase alle 3 Stunden. Es wurden jeweils Einzeldosen der zu testenden Antibiotika verabreicht und die Kombinationstherapie wurde gegen 4 Carbapenem-resistente Bakterienstämme über 48 Stunden untersucht. Es erfolgte außerdem eine Resistenzbestimmung durch Ausplattieren der Bakterienstämme aus dem Blasen-Modell zu drei verschiedenen Zeitpunkten auf Antibiotika-enthaltende Agarplatten mit einer Antibiotikakonzentration von 1x und 4x MIC. Die erfolgreich im Blasen-Modell getesteten Antibiotikakombinationen waren Ertapenem mit jeweils Levofloxacin, Rifampicin oder Fosfomycin. Die Kombination von Ertapenem und Levofloxacin ist aufgrund erhöhter Resistenzraten gegenüber Fluorchinolonen und schlechterer Wirksamkeit von Levofloxacin in AU am wenigsten zu empfehlen. Die größte Empfehlung kann für die Kombination aus Ertapenem und Fosfomycin ausgesprochen werden, da diese gegen alle untersuchten Bakterienstämme gut wirksam war und Fosfomycin als nebenwirkungsarmes Antibiotikum häufige Anwendung vor allem in der Therapie von HWI findet. Die Kombinationstherapie aus Ertapenem und Fosfomycin wurde in der Literatur bereits von mehreren Autoren *in vitro* auf ihre Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Bakterienarten untersucht und auch Fallberichte über die erfolgreiche Anwendung in der Klinik sind vorhanden. Die überwiegende Anzahl der mit dieser Arbeit vergleichbaren *in vitro* Versuche wurde lediglich in starren Versuchsmodellen wie Checkerboard- oder Time-Kill-Assays und nur in CAMHB durchgeführt. Die Übertragbarkeit der so gefundenen Daten auf die Situation *in vivo* ist beschränkt. Es wurde daher in dieser Arbeit zusätzlich zu Checkerboard-Assays ein dynamisches Blasen-Modell zur Simulation der Pharmakodynamik und -kinetik im Menschen verwendet und die Versuche wurden mit AU in einem Medium durchgeführt, welches dem späteren Zielmedium der Antibiotika *in vivo* in seinen Eigenschaften möglichst nahekommt. Weitere Untersuchungen im Tiermodell und in klinischen Studien zur Bestätigung der Wirksamkeit der gefundenen Antibiotikakombinationen müssen zukünftig durchgeführt werden.

5. Conclusion

Antibiotic resistances are spreading around the globe and are a huge threat to the healthcare systems. New ways to use the available antibiotics in an optimal way must be found, as the development of new antibiotic substances in the near future is not likely. Urinary tract infections (UTI) are the cause for many antibiotic prescriptions in the outpatient setting as well as in hospitals and thereby also contributing to the further emerge of new resistances. *Enterobacteriaceae*, who are often the pathogens causing UTI, have been showing particularly problematic resistances lately. Carbapenems are often the antibiotics of last resort but are threatened by the global spread of carbapenemase-producing and thereby carbapenem-resistant bacteria, which are mostly *Enterobacteriaceae*. There is a lack of randomised, controlled studies regarding the treatment of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) thus no well-founded therapy recommendation can be given. There are indeed numerous hints in literature pointing to the possibility that a combination therapy containing a Carbapenem could be most effective to treat CRE.

The goal of this dissertation was to eradicate CRE by using Carbapenem containing combination therapy. 4 Carbapenemase-producing bacterial strains were examined, 2 KPC-producing and 2 NDM-producing strains. The usage of the combination therapy was studied in a dynamic bladder-model, thereby investigating the use in UTI.

First, minimal inhibitory (MIC) and bactericidal concentrations were measured in artificial urine (AU) and cation-adjusted Müller-Hinton broth (CAMHB). By using the discovered MIC, combination testing of Meropenem or Ertapenem as representatives of the Carbapenems together with 8 other antibiotics in Checkerboard-assays was carried out, using AU and CAMHB as mediums. Those antibiotic combinations, which could achieve the most effective MIC reduction applied on most bacteria, were subsequently examined in a dynamic bladder-model. Here, the simulation of physiological pharmacodynamics and pharmacokinetics with an average urine production of 1.5 litres per day and voiding of the bladder every 3 hours was carried out. Single doses of the tested antibiotics were used, and the combination therapy was tested against 4 Carbapenem-resistant bacterial strains over 48 hours. Furthermore, resistance testing was carried out by plating out the bacterial strains from the bladder-model on antibiotic containing agar plates with antibiotic concentrations of 1x and 4x MIC at 3 different time points. The antibiotic combinations successfully tested in the bladder-model were Ertapenem plus Levofloxacin, Rifampicin or Fosfomycin.

The combination of Ertapenem and Levofloxacin is the least recommendable, because of high resistance rates against Fluoroquinolones and a low efficiency of Levofloxacin in AU. The highest recommendation can be made for the combination of Ertapenem and Fosfomicin, because it was effective against all tested strains and Fosfomicin, as a therapeutic with low side effects, is regularly used especially in the treatment of UTI. Many authors have already examined the effectiveness of a combination of Ertapenem and Fosfomicin against different pathogens in vitro and there are also a few case reports about the successful use of the combination in clinic. The vast majority of the trials comparable to this work have only been carried out in rigid experimental setups like Checkerboard- or Time-Kill-Assays and the medium used was CAMHB. The results' transmissibility of these trials onto the situation in vivo is fairly limited. Therefore, in this study the combination therapy was examined in a dynamic bladder-model simulating the human pharmacodynamics and pharmacokinetics additionally to the Checkerboard-assays. Furthermore, by using AU as medium, the trials were carried out in a medium very similar in its characteristics to the target medium of the antibiotics in vivo. Further trials in animal models and clinical studies to confirm the findings of this study regarding the efficiency of the antibiotic combinations must be carried out in the future.

6. Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AU	artifizieller Urin
CAMHB	cation-adjusted Müller-Hinton broth
CFU	Colony forming units
CRE	Carbapenem-resistente Enterobacteriaceae
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
ECDC	European Center of Disease Control and Prevention
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	extended-Spektrum-beta-Laktamase
fc	fold change
FIC	Fractional inhibitory concentration
g	Gramm
GES	Guiana Extended Spectrum
GIM	German Imipenemase
HWI	Harnwegsinfektion
IMI	Imipenem hydrolysing Betalaktamase
KPC	Klebsiella pneumoniae Carbapenemase
MBC	minimal bactericidal concentration
mg	Milligramm
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NDM	New Delhi metallo-β-lactamase
OD	optische Dichte
OXA	Oxacillinase
PBP	Penicillin-Bindungs-Proteine
SIM	Seoul imipenemase
SME	Serratia marcescens enzymes
TSB	Tryptic soy broth
vgl.	vergleiche
VIM	Verona integron-encoded metallo—lactamase
µg, µl	Mikrogramm, Mikroliter

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Struktur von Carbapenemen	10
2	Carbapenem-Resistenz bei <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> und <i>Acinetobacter</i> in Staaten der EU	12
3	Internationale Ausbreitung KPC-produzierender Enterobacteriaceae	13
4	Schema Checkerboard	31
5	Versuchsaufbau mit einem Antibiotikum	33
6	Versuchsaufbau mit zwei Antibiotika	33
7	Im Blasen-Modell gemessene Antibiotikakonzentrationen für Levofloxacin, Rifampicin, Ertapenem und Fosfomycin sowie die berechnete Antibiotikakonzentration, die hätte erreicht werden sollen.	53
8	Bakterienwachstum für <i>E. coli</i> NRZ 14408, <i>E. cloacae</i> BAA 2468, <i>E. coli</i> BAA 2469 und <i>K. pneumoniae</i> BAA 1705 ohne Antibiotikum, unter Ertapenem, unter Levofloxacin sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Levofloxacin	54
9	Bakterienwachstum für <i>E. coli</i> NRZ 14408, <i>E. cloacae</i> BAA 2468, <i>E. coli</i> BAA 2469 und <i>K. pneumoniae</i> BAA 1705 ohne Antibiotikum, unter Ertapenem, unter Rifampicin sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Rifampicin	55
10	Bakterienwachstum für <i>E. coli</i> NRZ 14408, <i>E. cloacae</i> BAA 2468, <i>E. coli</i> BAA 2469 und <i>K. pneumoniae</i> BAA 1705 ohne Antibiotikum, unter Ertapenem, unter Fosfomycin sowie unter Kombinationstherapie aus Ertapenem und Fosfomycin	56
11	Ertapenem-resistente Klone unter Therapie mit Ertapenem, Ertapenem und Levofloxacin, Ertapenem und Rifampicin sowie Ertapenem und Fosfomycin	58
12	Rifampicin-resistente Klone unter Therapie mit Rifampicin sowie Ertapenem und Rifampicin	59
13	Fosfomycin-resistente Klone unter Therapie mit Fosfomycin sowie Ertapenem und Fosfomycin	60
14	Levofloxacin-resistente Klone unter Therapie mit Levofloxacin sowie Ertapenem und Levofloxacin	61

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Komplizierende Faktoren von Harnwegsinfektionen	3
2	<i>Therapieempfehlungen für unkomplizierte HWI</i>	7
3	Resistenzen der 4 getesteten Bakterienspezies gegenüber 6 häufig in der Behandlung von HWI eingesetzten Antibiotika.	8
4	Resistenzen für <i>E. coli</i> gegenüber den getesteten Antibiotika	9
5	Übersicht verwendeter Bakterienstämme	21
6	Übersicht verwendeter Antibiotika	22
7	Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe	23
8	Verwendete Utensilien mit Herstellerangabe	24
9	Verwendete Geräte mit Herstellerangabe	25
10	Rezept für artifiziellen Urin	26
11	Lösungsmittel und Zielkonzentration der verwendeten Antibiotika	28
12	Daten zur Berechnung der Antibiotikamenge, die zu Versuchsbeginn in den "Sekundärharn" des Blasen-Modells gegeben werden musste.	34
13	Die benötigte Sekundärharnmenge in Millilitern sowie die Menge an zugesetztem Antibiotikum	35
14	Median für die MIC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme.	38
15	MIC-Werte in mg/l in AU bei einem pH von 7,2 / 8,2 und einer Bakterienkonzentration von 10^5	40
16	Median der MIC-Werte für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme in mg/l in CAMHB/AU bei einer Bakterienmenge von 10^5 und 10^6 CFU/ml	41

17	Median für die MBC-Werte in mg/l in CAMHB/ AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme.	42
18	Median für die MIC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme.	43
19	Median für die MBC-Werte in mg/l in CAMHB / AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme.	44
20	Fold change der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme	45
21	Fold change der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme	45
22	Fold change der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme	47
23	Fold change der Meropenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Meropenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme	48
24	Fold change der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme	49
25	Fold change der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 3 Carbapenem-sensiblen Stämme	49
26	Fold change der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in CAMHB für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme	50
27	Fold change der Ertapenem-MIC-Reduktion in Kombination im Vergleich zu Ertapenem allein sowie Σ FICI-Werte, in AU für die 6 Carbapenem-resistenten Stämme	51

9. Literaturverzeichnis

Abbott, I.; Cerqueira, G. M.; Bhuiyan, S.; Peleg, A. Y. (2013): Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. In: *Expert review of anti-infective therapy* 11 (4), S. 395–409. DOI: 10.1586/eri.13.21.

Abbott, I.; Meletiadis, J.; Belghanch, I.; Wijma, R. A.; Kanioura, L.; Roberts, J. A. et al. (2018): Fosfomycin efficacy and emergence of resistance among *Enterobacteriaceae* in an in vitro dynamic bladder infection model. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 73 (3), S. 709–719. DOI: 10.1093/jac/dkx441.

Acocella, G.; Scotti, R. (1976): Kinetic studies on the combination rifampicin-trimethoprim in man. I. Absorption and urinary excretion after administration to healthy volunteers of single doses of the two compounds alone and in combination, and of the combination over a period of 1 week. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2 (3), S. 271–277. DOI: 10.1093/jac/2.3.271.

Actavis plc. (2015): Actavis Receives U.S. FDA Approval for AVYCAZ™ (CEFTAZIDIME- AVIBACTAM). Online verfügbar unter <https://www.prnewswire.com/news-releases/actavis-receives-us-fda-approval-for-avycaz-ceftazidime-avibactam-300041592.html>, zuletzt geprüft am 24.01.2020.

Akajagbor, D. S.; Wilson, S. L.; Shere-Wolfe, K. D.; Dakum, P.; Charurat, M. E.; Gilliam, B. L. (2013): Higher incidence of acute kidney injury with intravenous colistimethate sodium compared with polymyxin B in critically ill patients at a tertiary care medical center. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (9), S. 1300–1303. DOI: 10.1093/cid/cit453.

Ambler, R. P.; Coulson, A. F.; Frère, J. M.; Ghuysen, J. M.; Joris, B.; Forsman, M. et al. (1991): A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. In: *The Biochemical journal* 276 (Pt 1), S. 269–270. DOI: 10.1042/bj2760269.

Anderson, K. F.; Lonsway, D. R.; Rasheed, J. K.; Biddle, J.; Jensen, B.; McDougal, L. K. et al. (2007): Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. In: *Journal of clinical microbiology* 45 (8), S. 2723–2725. DOI: 10.1128/JCM.00015-07.

Band, V. I.; Hufnagel, D. A.; Jaggavarapu, S.; Sherman, E. X.; Wozniak, J. E.; Satola, S. W. et al. (2019): Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple

drugs effectively control infection. In: *Nature microbiology* 4 (10), S. 1627–1635. DOI: 10.1038/s41564-019-0480-z.

Barry, A. L. (1999): Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M26-A = vol. 19, no. 18).

Bergan, T. (1990): Degree of absorption, pharmacokinetics of fosfomycin trometamol and duration of urinary antibacterial activity. In: *Infection* 18 Suppl 2, S65-9. DOI: 10.1007/BF01643430.

Bergan, T.; Thorsteinsson, S. B.; Albini, E. (1993): Pharmacokinetic profile of fosfomycin trometamol. In: *Chemotherapy* 39 (5), S. 297–301. DOI: 10.1159/000239140.

Bleidorn, J.; Gágyor, I.; Kochen, M. M.; Wegscheider, K.; Hummers-Pradier, E. (2010): Symptomatic treatment (ibuprofen) or antibiotics (ciprofloxacin) for uncomplicated urinary tract infection?--results of a randomized controlled pilot trial. In: *BMC medicine* 8, S. 30. DOI: 10.1186/1741-7015-8-30.

Bonomo, R. A.; Szabo, D. (2006): Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43 Suppl 2, S49-56. DOI: 10.1086/504477.

Brochado, A. R.; Telzerow, A.; Bobonis, J.; Banzhaf, M.; Mateus, A.; Selkrig, J. et al. (2018): Species-specific activity of antibacterial drug combinations. In: *Nature* 559 (7713), S. 259–263. DOI: 10.1038/s41586-018-0278-9.

Butler CC et al. (2015): Incidence, severity, help seeking, and management of uncomplicated urinary tract infection: a population-based survey. In: *Br J Gen Pract.*, 65(639): e702-7.

Castanheira, M.; Farrell, S. E.; Krause, K. M.; Jones, R. N.; Sader, H. S. (2014): Contemporary diversity of β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in the nine U.S. census regions and ceftazidime-avibactam activity tested against isolates producing the most prevalent β -lactamase groups. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (2), S. 833–838. DOI: 10.1128/AAC.01896-13.

Center for Disease Control and Prevention (2009): Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 58 (10), S. 256–260.

Center for Disease Control and Prevention (2019): Clinicians: Information about CRE. Center for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-clinicians.html>, zuletzt aktualisiert am 13.11.2019, zuletzt geprüft am 26.01.2020.

Chien, S. C.; Rogge, M. C.; Gisclon, L. G.; Curtin, C.; Wong, F.; Natarajan, J. et al. (1997): Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (10), S. 2256–2260.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07-A10 ; approved standard. 10. ed. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards (Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute, 35,2).

Codjoe, F- S.; Donkor, E. S. (2017): Carbapenem Resistance. A Review. In: *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 6 (1). DOI: 10.3390/medsci6010001.

Cunha, B. A.; Hamid, N. S.; Krol, V.; Eisenstein, L. (2008): Safety of meropenem in patients reporting penicillin allergy. Lack of allergic cross reactions. In: *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 20 (2), S. 233–237. DOI: 10.1179/joc.2008.20.2.233.

Daikos, G. L.; Markogiannakis, A. (2011): Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. (when) might we still consider treating with carbapenems? In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17 (8), S. 1135–1141. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03553.x.

Dalhoff, A.; Schubert, S.; Vente, A. (2017): Pharmacodynamics of Finafloxacin, Ciprofloxacin, and Levofloxacin in Serum and Urine against TEM- and SHV-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (5). DOI: 10.1128/AAC.02446-16.

Dalhoff, A.; Stubbings, W.; Schubert, S. (2011): Comparative in vitro activities of the novel antibacterial finafloxacin against selected Gram-positive and Gram-negative

bacteria tested in Mueller-Hinton broth and synthetic urine. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (4), S. 1814–1818. DOI: 10.1128/AAC.00886-10.

Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (2018): Brennen beim Wasserlassen. S3-Leitlinie und Anwenderversion der S3-Leitlinie Harnwegsinfektionen (1), S. 9, zuletzt geprüft am 21.01.2020.

Dicheva, S. (2015): Harnwegsinfekte bei Frauen. Asgard Verlag Sieburg. In: *Barmer GEK Arzneimittelreport*, S. 107–137.

Dickstein, Y.; Lellouche, J.; Schwartz, D.; Nutman, A.; Rakovitsky, N.; Dishon Benattar, Y. et al. (2019): Colistin Resistance Development Following Colistin-Meropenem Combination Therapy vs. Colistin Monotherapy in Patients with Infections Caused by Carbapenem-Resistant Organisms. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. DOI: 10.1093/cid/ciz1146.

Drago, L.; Vecchi, E. de; Nicola, L.; Tocalli, L.; Gismondo, M. R. (2005): In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56 (2), S. 353–359. DOI: 10.1093/jac/dki204.

Drusano, G. L. (2003): Prevention of resistance. A goal for dose selection for antimicrobial agents. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36 (Suppl 1), S42-50. DOI: 10.1086/344653.

ECDC (2017): Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2015. DOI: 10.2900/80081.

Eliopoulos GM; Moellering, R. C., JR. (1996): Antimicrobial combinations. In: V. Lorian (Hg.): *Antibiotics in laboratory medicine*. 4. Aufl. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., S. 330-396.

EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents (2000). In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6 (9), S. 503–508.

European Centre for Disease Prevention and Control (2017): Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial

Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. [Luxembourg]: [Publications Office of the European Union] (Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016).

French, C. E.; Coope, C.; Conway, L.; Higgins, J. P. T.; McCulloch, J.; Okoli, G. et al. (2017): Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings. An evidence review. In: *The Journal of hospital infection* 95 (1), S. 3–45. DOI: 10.1016/j.jhin.2016.10.006.

Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T: Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115: 345–52. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0345

Gales, A. C.; Jones, R. N.; Sader, H. S. (2011): Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66 (9), S. 2070–2074. DOI: 10.1093/jac/dkr239.

Giamarellou, H.; Galani, L.; Baziaka, F.; Karaiskos, I. (2013): Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57 (5), S. 2388–2390. DOI: 10.1128/AAC.02399-12.

Gould, C. V.; Umscheid, C. A.; Agarwal, R. K.; Kuntz, G.; Pegues, D. A. (2010): Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. In: *Infection control and hospital epidemiology* 31 (4), S. 319–326. DOI: 10.1086/651091.

Grabe, M. et al (2015): Guidelines on urological infections. In: *EAU guidelines*. Online verfügbar unter http://uroweb.org/wp-content/uploads/19Urologicalinfections_LR2.pdf, zuletzt geprüft am 23.03.2019.

Grosset, J.; Leventis, S. (1983): Adverse effects of rifampin. In: *Reviews of infectious diseases* 5 Suppl 3, S440-50. DOI: 10.1093/clinids/5.supplement_3.s440.

Gupta, N.; Limbago, B. M.; Patel, J. B.; Kallen, A. J. (2011): Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Epidemiology and prevention. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 (1), S. 60–67. DOI: 10.1093/cid/cir202.

Hagihara, M.; Housman, S. T.; Nicolau, D. P.; Kutti, J. L. (2014): In vitro pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against

carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (2), S. 874–879. DOI: 10.1128/AAC.01624-13.

Hampel; Gillitzer, R.; Pahernik, S.; Thueroff, J. (2003): Besorgniserregende Resistenzentwicklungen bei Harnwegsinfekten. In: *Der Urologe* (42), S. 27–33.

Heisig, P. (2010): Harnwegsinfektionen und Antibiotikaresistenz. In: *Der Urologe* (49), S. 612–617. DOI: 10.1007/s00120-010-2259-y.

Herold, G. (Hg.) (2016): Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung. mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.

Heßdörfer, E. (2016): Bedenklicher Umgang mit Antibiotika bei HWI. In: *CME* 13 (1), S. 26–27. DOI: 10.1007/s11298-016-5582-9.

Heudorf, U.; Scherer, M.; Zweigner, J. (2016): MRE-Netz Rhein-Main: „Weniger ist mehr – Antibiotika verantwortungsvoll einsetzen“ – ein Kooperations-Projekt zur Vorbeugung von Antibiotikaresistenzen in Hessen. In: *Umwelt-Hygiene-Arbeitsmedizin* 21, S. 317–322. Online verfügbar unter http://www.mre-rhein-main.de/downloads/publikationen/wim_umweltmedizin-hygiene-arbeitsmedizin-band-21-nr-6-2016.pdf, zuletzt geprüft am 24.01.2020.

Hidron, A. I.; Edwards, J. R.; Patel, J.; Horan, T. C.; Sievert, D. M.; Pollock, D. A.; Fridkin, S. K. (2008): NHSN annual update. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. In: *Infection control and hospital epidemiology* 29 (11), S. 996–1011. DOI: 10.1086/591861.

Horcajada, J. P.; Sorlí, L.; Luque, S.; Benito, N.; Segura, C.; Campillo, N. et al. (2016): Validation of a colistin plasma concentration breakpoint as a predictor of nephrotoxicity in patients treated with colistin methanesulfonate. In: *International journal of antimicrobial agents* 48 (6), S. 725–727. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.020.

Hosgor-Limoncu, M.; Ermertcan, S.; Tasli, H.; Yurtman, A. N. (2008): Activity of amikacin, ertapenem, ciprofloxacin and levofloxacin alone and in combination against resistant nosocomial pathogens by time-kill. In: *The West Indian medical journal* 57 (2), S. 106–111.

Iarikov, D.; Wassel, R.; Farley, J.; Nambiar, S. (2015): Adverse Events Associated with Fosfomycin Use. Review of the Literature and Analyses of the FDA Adverse Event Reporting System Database. In: *Infectious diseases and therapy* 4 (4), S. 433–458. DOI: 10.1007/s40121-015-0092-8.

Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017 AWMF Registernummer: 043/044, http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043044I_S3_Harnwegsinfektionen.pdf (Zugriff am: 20.03.20).

Jacoby, G. A.; Munoz-Price, L. S. (2005): The new beta-lactamases. In: *The New England journal of medicine* 352 (4), S. 380–391. DOI: 10.1056/NEJMra041359.

Jenkins, S. G.; Schuetz, A. N. (2012): Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. In: *Mayo Clinic proceedings* 87 (3), S. 290–308. DOI: 10.1016/j.mayocp.2012.01.007.

Jitkova, Y.; Gronda, M.; Hurren, R.; Wang, X.; Goard, C. A.; Jhas, B.; Schimmer, A. D. (2014): A novel formulation of tigecycline has enhanced stability and sustained antibacterial and antileukemic activity. In: *PloS one* 9 (5), e95281. DOI: 10.1371/journal.pone.0095281.

Johnson, A. P.; Woodford, N. (2013): Global spread of antibiotic resistance. The example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. In: *Journal of medical microbiology* 62 (Pt 4), S. 499–513. DOI: 10.1099/jmm.0.052555-0.

Joly-Guillou, M. L.; Wolff, M.; Farinotti, R.; Bryskier, A.; Carbon, C. (2000): In vivo activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 46 (5), S. 827–830. DOI: 10.1093/jac/46.5.827.

Karageorgopoulos, D. E.; Miriagou, V.; Tzouvelekis, L. S.; Spyridopoulou, K.; Daikos, G. L. (2012): Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. Report of three cases. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67 (11), S. 2777–2779. DOI: 10.1093/jac/dks270.

Kaushik, A.; Makkar, N.; Pandey, P.; Parrish, N.; Singh, U.; Lamichhane, G. (2015): Carbapenems and Rifampin Exhibit Synergy against *Mycobacterium tuberculosis* and

Mycobacterium abscessus. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (10), S. 6561–6567. DOI: 10.1128/AAC.01158-15.

Kern, W. V. (2018): Multiresistente Bakterien. Antibiotikaverordnung und Reserveantibiotika. In: *Dtsch med Wochenschr* 143 (09), S. 643–650. DOI: 10.1055/s-0043-119958.

Lee, J.; Patel, G.; Huprikar, S.; Calfee, D. P.; Jenkins, S. G. (2009): Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (5), S. 1611–1612. DOI: 10.1128/JCM.02466-08.

Lemaire, S.; Van Bambeke, F.; Mingeot-Leclercq, Marie.; Glupczynski, Y.; Tulkens P. M. (2007): Role of Acidic pH in the Susceptibility of Intraphagocytic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains to Meropenem and Cloxacillin. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Apr 2007, 51 (5) 1627-1632. DOI: 10.1128/AAC.01192-06.

Liu YM; Guo JJ; MA X et al. (2010): Determination of Dissolution of Fosfomicin Sodium by Spectrophotometry with Alizarin. In: *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory* 04.

Livermore, D. M.; Warner, M.; Jamrozy, D.; Mushtaq, S.; Nichols, W. W.; Mustafa, N.; Woodford, N. (2015): In vitro selection of ceftazidime-avibactam resistance in *Enterobacteriaceae* with KPC-3 carbapenemase. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (9), S. 5324–5330. DOI: 10.1128/AAC.00678-15.

Loose, M.; Naber KG; Coates A (2019): Effect of different media on the bactericidal activity of colistin and on the synergistic combination with azidothymidine against mcr-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli*. In: *Front Microbiol* (under Review).

Loose, M.; Link, I.; Naber, K. G.; Wagenlehner, F. M. E. (2019): Carbapenem-Containing Combination Antibiotic Therapy against Carbapenem-Resistant Uropathogenic *Enterobacteriaceae*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64 (1). DOI: 10.1128/AAC.01839-19.

Loose, M.; Naber, K. G.; Shields, P.; Reinhart, H.; Wagenlehner, F. M. E. (2018): Urinary concentrations and antimicrobial activity of tobramycin in healthy volunteers receiving a single oral dose of a novel formulation for improved absorption. In: *International journal of antimicrobial agents* 51 (3), S. 422–426. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.004.

- Lorian, V. (Hg.) (1996): Antibiotics in laboratory medicine. 4. Aufl. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- Marcon, J.; Stief, C. G.; Magistro, G. (2017): Harnwegsinfektionen. In: *Der Internist* 58 (12), S. 1242–1249. DOI: 10.1007/s00108-017-0340-y.
- Marshall, A. J.; Piddock, L. J. (1994): Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 34 (4), S. 465–483. DOI: 10.1093/jac/34.4.465.
- Mathers, A. J.; Hazen, K. C.; Carroll, J.; Yeh, A. J.; Cox, H. L.; Bonomo, R. A.; Sifri, C. D. (2013): First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. The "menace" arrives in the new world. In: *Journal of clinical microbiology* 51 (2), S. 680–683. DOI: 10.1128/JCM.02580-12.
- Meletis, G.; Exindari, M.; Vavatsi, N.; Sofianou, D.; Diza, E. (2012): Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Hippokratia* 16 (4), S. 303–307.
- Moquet, O.; Bouchiat, C.; Kinana, A.; Seck, A.; Arouna, O.; Bercion, R. et al. (2011): Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Enterobacteria*, Senegal. In: *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), S. 143–144. DOI: 10.3201/eid1701.100224.
- Morrill, H. J.; Pogue, J. M.; Kaye, K. S.; LaPlante, K. L. (2015): Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. In: *Open forum infectious diseases* 2 (2), ofv050. DOI: 10.1093/ofid/ofv050.
- Musson, D. G.; Majumdar, A.; Holland, S.; Birk, K.; Xi, L.; Mistry, G. et al. (2004): Pharmacokinetics of total and unbound ertapenem in healthy elderly subjects. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (2), S. 521–524. DOI: 10.1128/AAC.48.2.521-524.2004.
- Naber, K. G., et al (2011): Epidemiologie, Diagnostik, Therapie und Management unkomplizierter bakterieller ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei der erwachsenen Patientin. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* (71.11), R94-R114.
- Navarro-San Francisco, C.; Mora-Rillo, M.; Romero-Gómez, M. P.; Moreno-Ramos, F.; Rico-Nieto, A.; Ruiz-Carrascoso, G. et al. (2013): Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. A major clinical challenge. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (2), E72-9. DOI: 10.1111/1469-0691.12091.

Nordmann, P.; Cuzon, G.; Naas, T. (2009): The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. In: *The Lancet Infectious Diseases* 9 (4), S. 228–236. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4.

Nordmann, P.; Dortet, L.; Poirel, L. (2012): Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. Here is the storm! In: *Trends in molecular medicine* 18 (5), S. 263–272. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.

Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L. (2011): Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In: *Emerging infectious diseases* 17 (10), S. 1791–1798. DOI: 10.3201/eid1710.110655.

Papp-Wallace, K. M.; Endimiani, A.; Taracila, M. A.; Bonomo, R. A. (2011): Carbapenems. Past, present, and future. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (11), S. 4943–4960. DOI: 10.1128/AAC.00296-11.

Patel, G.; Huprikar, S.; Factor, S. H.; Jenkins, S. G.; Calfee, D. P. (2008): Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. In: *Infection control and hospital epidemiology* 29 (12), S. 1099–1106. DOI: 10.1086/592412.

Paul, M.; Carmeli, Y.; Durante-Mangoni, E.; Mouton, J. W.; Tacconelli, E.; Theuretzbacher, U. et al. (2014): Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69 (9), S. 2305–2309. DOI: 10.1093/jac/dku168.

Peleg, A. Y.; Franklin, C.; Bell, J. M.; Spelman, D. W. (2005): Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41 (11), S. 1549–1556. DOI: 10.1086/497831.

Perez, F.; Endimiani, A.; Ray, A. J.; Decker, B. K.; Wallace, C. J.; Hujer, K. M. et al. (2010): Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system. Impact of post-acute care facilities on dissemination. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65 (8), S. 1807–1818. DOI: 10.1093/jac/dkq191.

Perry, J. D.; Naqvi, S. H.; Mirza, I. A.; Alizai, S. A.; Hussain, A.; Ghirardi, S. et al. (2011): Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66 (10), S. 2288–2294. DOI: 10.1093/jac/dkr299.

- Petrosillo, N.; Giannella, M.; Lewis, R.; Viale, P. (2013): Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The state of the art. In: *Expert review of anti-infective therapy* 11 (2), S. 159–177. DOI: 10.1586/eri.12.162.
- Queenan, A. M.; Bush, K. (2007): Carbapenemases. The versatile beta-lactamases. In: *Clinical microbiology reviews* 20 (3), 440-58, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.00001-07.
- Qureshi, Z. A.; Paterson, D. L.; Potoski, B. A.; Kilayko, M. C.; Sandovsky, G.; Sordillo, E. et al. (2012): Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Superiority of combination antimicrobial regimens. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (4), S. 2108–2113. DOI: 10.1128/AAC.06268-11.
- Raymond, B. (2019): Five rules for resistance management in the antibiotic apocalypse, a road map for integrated microbial management. In: *Evolutionary applications* 12 (6), S. 1079–1091. DOI: 10.1111/eva.12808.
- Richards, G. A.; Brink, A. J.; Feldman, C. (2019): Rational use of the fluoroquinolones. In: *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 109 (6), S. 378–381. DOI: 10.7196/samj.2019.v109i6.14002.
- Rosa, R.; Rudin, S. D.; Rojas, L. J.; Hujer, A. M.; Perez-Cardona, A.; Perez, F. et al. (2018): "Double carbapenem" and oral fosfomycin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by bla_{NDM}-harboring *Enterobacteriaceae* in kidney transplantation. In: *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 20 (1). DOI: 10.1111/tid.12795.
- S2k Leitlinie: Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen, Update 2018, 2. aktualisierte Version, erstellt am 25.Juli 2019, AWMF-Registernummer 082-006, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08.pdf, Zugriff am 22.02.2021
- Saballs, M.; Pujol, M.; Tubau, F.; Peña, C.; Montero, A.; Domínguez, M. A. et al. (2006): Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58 (3), S. 697–700. DOI: 10.1093/jac/dkl274.

Sader, H. S.; Farrell, D. J.; Flamm, R. K.; Jones, R. N. (2014): Variation in potency and spectrum of tigecycline activity against bacterial strains from U.S. medical centers since its approval for clinical use (2006 to 2012). In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (4), S. 2274–2280. DOI: 10.1128/AAC.02684-13.

Samonis, G.; Maraki, S.; Karageorgopoulos, D. E.; Vouloumanou, E. K.; Falagas, M. E. (2012): Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (5), S. 695–701. DOI: 10.1007/s10096-011-1360-5.

Sánchez, M. B. (2015): Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 658. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00658.

Sbrana, F.; Malacarne, P.; Viaggi, B.; Costanzo, S.; Leonetti, P.; Leonildi, A. et al. (2013): Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (5), S. 697–700. DOI: 10.1093/cid/cis969.

Schlessinger, D. (1988): Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobic, low-pH, and resistant cultures. In: *Clinical microbiology reviews* 1 (1), S. 54–59. DOI: 10.1128/cmr.1.1.54.

Schwaber, M. J.; Klarfeld-Lidji, S.; Navon-Venezia, S.; Schwartz, D.; Leavitt, A.; Carmeli, Y. (2008): Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (3), S. 1028–1033. DOI: 10.1128/AAC.01020-07.

Schwaber, M. J.; Lev, B.; Israeli, A.; Solter, E.; Smollan, G.; Rubinovitch, B. et al. (2011): Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (7), S. 848–855. DOI: 10.1093/cid/cir025.

Schweizer, H. (2002): Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. In: *Genetics and Molecular Research* 2, S. 48–62. Online verfügbar unter http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0002_abstract.htm.

Seija, V.; Medina Presentado, J. C.; Bado, I.; Papa Ezdra, R.; Batista, N.; Gutierrez, C. et al. (2015): Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomycin and meropenem. Case report and literature review. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 30, S. 20–26. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.09.010.

Shah, P. M.; Isaacs, R. D. (2003): Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52 (4), S. 538–542. DOI: 10.1093/jac/dkg404.

Souli, M.; Galani, I.; Boukovalas, S.; Gourgoulis, M. G.; Chryssouli, Z.; Kanellakopoulou, K. et al. (2011): In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (5), S. 2395–2397. DOI: 10.1128/AAC.01086-10.

Stickler DJ, Morris NS, Winters C. Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. *Methods Enzymol.* 1999;310:494-501. doi: 10.1016/s0076-6879(99)10037-5. PMID: 10547813.

Student*innenschaft der Philipps-Universität Marburg (06/2017): Satzung der Student*innenschaft der Philipps-Universität Marburg, S. 30. Online verfügbar unter https://www.asta-marburg.de/fileadmin/Gremien/StuPa/Satzung_der_Student_innenschaft_2017.pdf, zuletzt geprüft am 26.01.2020.

Tängdén, T. (2014): Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. In: *Upsala journal of medical sciences* 119 (2), S. 149–153. DOI: 10.3109/03009734.2014.899279.

Tuon, F. F.; Rocha, J. L.; Formighieri, M. S.; Sfair, S.; Bertoldi, M. B.; Palmeiro, J. K.; Dalla Costa, L. M. (2013): Fosfomycin susceptibility of isolates with blaKPC-2 from Brazil. In: *The Journal of infection* 67 (3), S. 247–249. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.04.017.

- Tyers, M.; Wright, G. D. (2019): Drug combinations. A strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. In: *Nature reviews. Microbiology* 17 (3), S. 141–155. DOI: 10.1038/s41579-018-0141-x.
- Tzouveleakis, L. S.; Markogiannakis, A.; Piperaki, E.; Souli, M.; Daikos, G. L. (2014): Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (9), S. 862–872. DOI: 10.1111/1469-0691.12697.
- van der Bij, A. K.; Pitout, J. D. D. (2012): The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67 (9), S. 2090–2100. DOI: 10.1093/jac/dks214.
- Wagenlehner, F.M.E.; Niemetz, A.; Naber, K. G. (2003): Erregerspektrum und Antibiotikaresistenz beim Harnwegsinfekt und Konsequenzen für die Antibiotikatherapie. In: *Der Urologe* 42 (1), S. 13–25. DOI: 10.1007/s00120-002-0265-4.
- Wagenlehner, F.M.E.; Naber, K. G. (2004): Antibiotics and Resistance of Uropathogens. In: *EAU Update Series* 2 (3), S. 125–135. DOI: 10.1016/j.euus.2004.06.003.
- Wagenlehner, F.M.E.; Pilatz, A.; Weidner, W.; Magistro, G. (2014): Antibiotikaresistenz und deren Bedeutung bei urogenitalen Infektionen. In: *Der Urologe* (53).
- Wagenlehner, F.M.E. et al (2010): Klinik und Epidemiologie der unkomplizierten Zystitis bei Frauen. In: *Der Urologe* (49(2)), S. 253–261. DOI: 10.1007/s00120-009-2145-7.
- Wagenlehner, F. M. E.; Kinzig-Schippers, M.; Tischmeyer, U.; Wagenlehner, C.; Sörgel, F.; Dalhoff, A.; Naber, K. G. (2006): Pharmacokinetics of ciprofloxacin XR (1000 mg) versus levofloxacin (500 mg) in plasma and urine of male and female healthy volunteers receiving a single oral dose. In: *International journal of antimicrobial agents* 27 (1), S. 7–14. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.014.
- WHO (2019): Ten threats to global health in 2019. Hg. v. WHO. WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019>, zuletzt geprüft am 24.01.2020.
- Wijma, R. A.; Huttner, A.; van Dun, S.; Kloezen, W.; Abbott, I. J.; Muller, A. E. et al. (2019): Urinary antibacterial activity of fosfomycin and nitrofurantoin at registered dosages in healthy volunteers. In: *International journal of antimicrobial agents* 54 (4), S. 435–441. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.07.018.

Wiskirchen, D. E.; Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. (2013): Impact of various conditions on the efficacy of dual carbapenem therapy against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. In: *International journal of antimicrobial agents* 41 (6), S. 582–585. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.02.015.

Yigit, H.; Queenan, A. M.; Anderson, G. J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J. W.; Steward, C. D. et al. (2001): Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (4), S. 1151–1161. DOI: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.

Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, Hyun S.; Sundman, Kr.; Lee, K.; Walsh, T. R. (2009): Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (12), S. 5046–5054. DOI: 10.1128/AAC.00774-09.

Yu, W.; Shen, P.; Bao, Z.; Zhou, K.; Zheng, B.; Ji, J. et al. (2017): In vitro antibacterial activity of fosfomycin combined with other antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. In: *International journal of antimicrobial agents* 50 (2), S. 237–241. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.011.

Zavascki, A. P.; Bulitta, J. B.; Landersdorfer, C. B. (2013): Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. In: *Expert review of anti-infective therapy* 11 (12), S. 1333–1353. DOI: 10.1586/14787210.2013.845523.

Zhou, J.; Sulaiman, Z.; Llorin, R. M.; Hee, K.; Lee, L.; Lye, D. C. et al. (2014): Pharmacokinetics of ertapenem in outpatients with complicated urinary tract infections. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69 (9), S. 2517–2521. DOI: 10.1093/jac/dku143.

10. Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2019 bereits als Originalarbeit im Journal „Antimicrobial Agents and Chemotherapy“ (impact factor 4,715) veröffentlicht:

Loose, M.; Link, I.; Naber, K. G.; Wagenlehner, F. M. E. (2019): Carbapenem-Containing Combination Antibiotic Therapy against Carbapenem-Resistant Uropathogenic Enterobacteriaceae. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64 (1). DOI: 10.1128/AAC.01839-19.

Außerdem erfolgte die Präsentation der Ergebnisse in Form eines Posters auf dem 11. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Tübingen

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner, für die Möglichkeit, dieses Thema im Rahmen meiner Promotion zu erörtern, bedanken.

Großer Dank gilt Frau Dr. Maria Loose für die hervorragende Betreuung während allen Phasen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn David Eckert für einfach alles.