

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Wirksamkeit ausgewählter Antibiotika auf bakterielle
Erreger von Lungeninfektionen bei Patienten mit Mu-
koviszidose unter aeroben und anaeroben Wachstums-
bedingungen sowie unter Biofilmwachstum**

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

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

**vorgelegt von
Falk Zanker
aus
Stuttgart**

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Flehmig

Für Dorothee und Gerhard

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cystische Fibrose	1
1.2	Chronische Lungeninfektionen bei CF	1
1.3	Anaerobe Wachstumsbedingungen	4
1.4	Biofilm	5
1.5	Therapie der Lungeninfektionen	9
1.6	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Herstellung von Bakterienkulturen	11
2.2	Erstellen von Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen	12
2.3	Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen planktonisch aerob und anaerob kultivierte Bakterien	13
2.4.	Durchführung eines Biofilmtests	15
2.4.1.	Nachweis der Biofilmbildung	16
	a) Lichtmikroskop	16
	b) Rasterelektronenmikroskop	16
	c) Indirekte Immunfluoreszenz	17
2.4.2	Lebendkeimnachweis im Biofilm mit Hilfe eines Vitalitätstests	18
2.4.3	Keimzahlbestimmung im Biofilm	20
2.4.4	Untersuchung der Wirksamkeit von Meropenem und Ciprofloxacin in Biofilm	23
2.5	Einfluß von Azithromycin und DNase auf die Biofilmbildung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Wachstum unter anaeroben Bedingungen	25
3.2	Bilder des Biofilms an der Zapfenplatte	27
3.3	Keimzahlreduktionen der Bakterien durch Antibiotika	29
3.3.1	Meropenem gegen <i>P. aeruginosa</i>	29
3.3.2	Meropenem gegen <i>S. aureus</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>E.coli</i>	31

3.3.3	Ciprofloxacin gegen <i>P. aeruginosa</i>	33
3.3.4	Ciprofloxacin gegen <i>S. aureus</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>E. coli</i>	34
3.3.5	Ceftazidim gegen <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>E. coli</i>	36
3.3.6	Tobramycin gegen <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>E. coli</i>	38
3.3.7	Zusammenfassung	40
3.4	Einfluß von Azithromycin und DNase auf die Biofilmbildung von <i>P. aeruginosa</i>	40
4	Diskussion	42
4.1	Erläuterungen zu den Methoden	42
4.2	Wirkungen der Antibiotika	42
4.2.1	Meropenem	42
4.2.2	Ciprofloxacin	47
4.2.3	Ceftazidim	50
4.2.4	Tobramycin	51
4.3	Inhibition des Biofilmwachstums	52
4.4	Neue Strategien zur Therapie chronischer Lungeninfektionen bei CF	53
5	Zusammenfassung	54
6	Anhang	55
7	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	67
	Lebenslauf	68

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1 auf 2500 Lebendgeburten [75]. Verursacht wird sie durch Mutationen auf einem Gen, das auf Chromosom 7 liegt und ein Protein kodiert, den sogenannten „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) [88]. Das CFTR-Protein fungiert hauptsächlich als Chloridionenkanal an Membranen von Epithel- und Drüsenzellen [15]. Ist es defekt, entstehen krankhafte Veränderungen an Organen mit exokriner Drüsenfunktion. Es kommt zur Bildung eines hochviskösen Sekrets, vor allem an der Epitheloberfläche des Respirations- und des Gastrointestinaltrakts, wobei die schwerwiegendsten Veränderungen die Lunge betreffen [26], da sie chronische Infektionen nach sich ziehen, an denen über 90% der Patienten sterben [91].

1.2 Chronische Lungeninfektionen bei CF

Am häufigsten werden chronische Lungeninfektionen verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa*, gefolgt von *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* und *Burkholderia cepacia* [39]. In den ersten Lebensjahren wird die Lunge der Patienten vor allem mit *S. aureus* infiziert, grampositiven Kokken, die hauptsächlich für nosokomiale Infektionen verantwortlich sind, sowie *H. influenzae*, schnellwachsenden, unbekapselten, gramnegativen Stäbchen, die bei chronischer Bronchitis beteiligt sind. Mit zunehmendem Alter dominiert jedoch *P. aeruginosa*, ein ubiquitärer Umweltkeim. Die meisten Patienten versterben an einer Infektion mit *P. aeruginosa* [45, 52]. In gesunden Lungen ist das Immunsystem in der Lage, vor allem mit Hilfe von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Bakterien wie *P. aeruginosa* in Kürze zu eradizieren, in CF-Lungen ist dies jedoch nicht der Fall [30]. Hier kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion, welche die Lungen fortlaufend schädigt [75]. Obwohl die pathogenetischen

Mechanismen noch nicht endgültig verstanden sind, werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Khan et. al. gehen davon aus, daß die Atemwege von CF-Patienten schon in den ersten Monaten des Lebens entzündet sind, bevor Infektionen auftreten [51]. Imundo et. al. und Poschet et. al. zeigen, daß Bestandteile der Epithelzellen bei CF verändert sind, was dazu führen kann, daß Keime wie *P. aeruginosa* oder *S. aureus* verstärkt an diese gebunden werden, wodurch das Risiko einer Infektion steigt. [50, 72]. In der Arbeit von Pier wurde das CFTR-Protein als ein Rezeptor beschrieben, der bei normaler Funktion fähig ist, *P. aeruginosa* aufzunehmen und zu töten [70]. Ein defektes CFTR-Protein ist dagegen nicht fähig, die Bakterien zu binden und aufzunehmen, worauf diese sich ungehindert im Lumen des Respirationstrakts vermehren und Infektionen auslösen können. Laut Smith et. al. und Widdicombe führt eine erhöhte Sekretion von Kochsalz der Epithelzellen des Respirationstrakts zu einer Inaktivierung von Defensinen, Molekülen der körpereigenen Abwehr. Diese können dann nicht mehr Bakterien abtöten, wodurch Infektionen begünstigt werden [79, 93]. Matsui et. al. gehen davon aus, daß eine abnorme Absorption von Natriumionen, verbunden mit der Unfähigkeit des CFTR-Kanals, Chloridionen zu sezernieren, zu einer Volumenreduktion des Flüssigkeitsfilms an der Oberfläche der Epithelzellen führt [60]. Dadurch kommt es zur Bildung eines verdickten zähflüssigen Schleims, der die mukoziliäre Reinigung und das Abhusten erheblich beeinträchtigt. Laut Worlitzsch et. al. finden Keime wie *P. aeruginosa*, die in diesen Schleim eindringen, mikroaerophile bis anaerobe Wachstumsbedingungen vor. Diese bewirken, daß die Bakterien von einem nonmukoiden auf einen mukoiden Phänotyp mit vermehrter Produktion von Exopolysacchariden umschalten. Dadurch kommt es zur verstärkten Bildung von sogenanntem Biofilm, in dem die Bakterien vor dem Immunsystem geschützt sind [96] (s. Abb. 1).

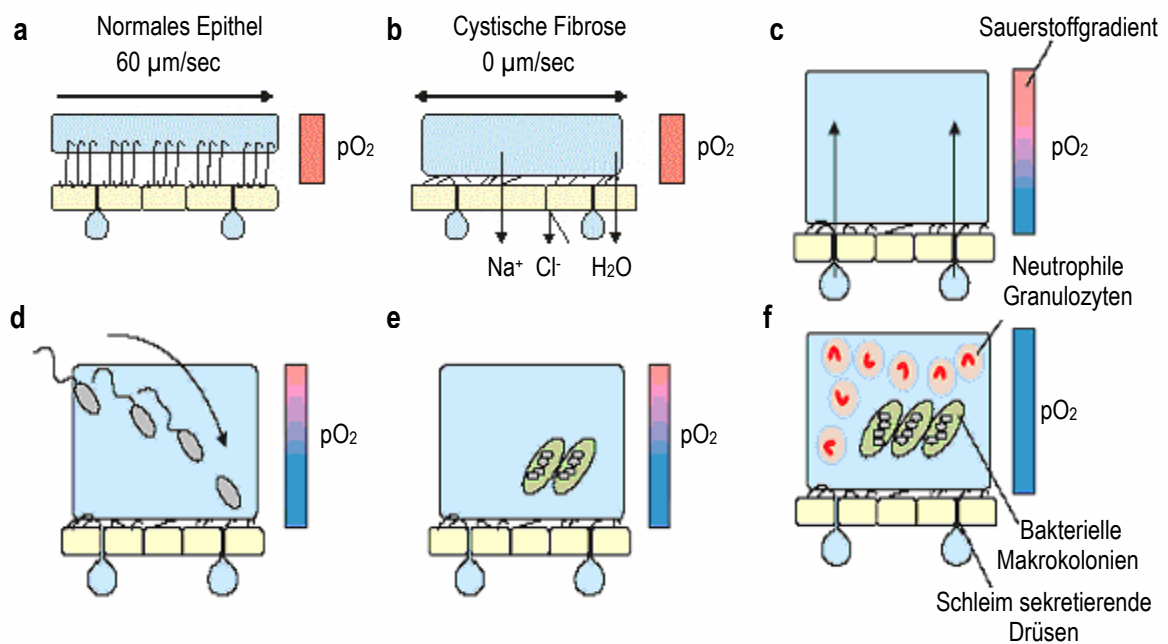


Abb. 1 a-f: Pathogenetische Hypothese der Lungenerkrankung bei CF: Blaue Felder=Schleimschicht; gelbe Felder=Epithelzellen des Atemtrakts. Sauerstoffgradient (pO₂): rot=aerobe Bedingungen, blau=anaerobe Bedingungen. Normale mukoziliäre Clearance (a) ist bei CF (b) aufgrund pathologischer Ionenverhältnisse, die zur Bildung von hochviskosem Schleim führen (c), nicht vorhanden. Mikroaerophile bis anaerobe Bedingungen (blauer Balken), die aufgrund verstärkter Sauerstoffatmung der Epithelzellen entstehen, werden von eindringenden *P. aeruginosa* wahrgenommen (d), worauf die Bakterien verstärkt Alginat (e) und schließlich Makrokolonien aus Biofilm (grün) bilden (f). Modifizierte Graphik aus [96].

Aus den vorangestellten Hypothesen wird deutlich, daß die Entstehung chronisch entzündlicher Lungeninfektionen ein multifaktorielles Geschehen darstellt. Für die Therapie von CF-Lungeninfektionen sind die Faktoren anaerobes Wachstum und Biofilm von großer Bedeutung, da bekannt ist, daß sie die Wirkung von Antibiotika abschwächen können [69; 82]. Von mukoiden, Biofilm bildenden *P. aeruginosa* ist zudem bekannt, daß sie in CF-Lungen durch Antibiotika nicht eradiziert werden können [31].

1.3 Anaerobe Wachstumsbedingungen

Von Worlitzsch et. al. wurde die Hypothese aufgestellt, daß die anaeroben Bedingungen in der CF-Lunge für *P. aeruginosa* ein Auslöser sind, verstärkt Biofilm zu bilden [96]. Als fakultativen Anaerobiern ist es Bakterien wie *P. aeruginosa* möglich, anaerob zu überleben, wenn geeignete Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Nitrit oder Arginin zur Verfügung stehen [43]. In der Arbeit von Worlitzsch et. al. wurde der Gehalt von Nitrat in CF-Lungen gemessen, es stellte sich heraus, daß er sehr niedrig ist (ca. 20 µM) [96]. Des Weiteren konnte dort gezeigt werden, daß dieser limitierte Gehalt von Nitrat *P. aeruginosa* dazu veranlaßt, die Alginateproduktion deutlich zu erhöhen, und daß selbst nonmukoiden Stämme unter diesen Bedingungen auf einen mukoiden Zelltyp umschalten und massiv Alginate produzieren. Daraus läßt sich schließen, daß der anaerobe Streß ein Trigger für die Bakterien ist, in einen mukoiden Phänotyp überzugehen, was ihnen die Möglichkeit gibt, Biofilm zu bilden.

Es ist bekannt, daß anaerobe Bedingungen die Wirkung vieler Antibiotika reduzieren [69]. So wirken verschiedene β -Lactam-Antibiotika, wie z.B. Ceftazidim gegen *P. aeruginosa*, unter anaeroben Bedingungen schlechter [5]. Eine schlechtere Wirkung von Aminoglykosiden gegen verschiedene gramnegative und grampositive Keime unter anaeroben Bedingungen ist ebenfalls beschrieben worden [85], ebenso für Chinolone wie Ciprofloxacin [98]. Für dieses Phänomen existieren verschiedene Erklärungen. So können ein gedrosselter Stoffwechsel unter anaeroben Bedingungen und ein langsames Wachstum die Wirksamkeit der Antibiotika abschwächen. Dies erscheint gerade für β -Lactam-Antibiotika plausibel, die nur wachsende Bakterien abtöten, indem sie die Zellwandsynthese inhibieren [53]. Des Weiteren kann sich die Wirksamkeit von Antibiotika vermindern, indem sich der Stoffwechsel des Bakteriums verändert und dadurch die Antibiotika nicht mehr an ihren Wirkungsort gelangen können oder unwirksam werden [43]. Mögliche Ursachen sind außerdem eine verminderte Aufnahme der Antibiotika in das Bakterium aufgrund einer strukturellen

Veränderung von Membrankanälen, eine Verminderung des intrazellulären pHs oder eine Synthesehemmung innerhalb des bakteriellen Stoffwechsels [98].

1.4 Biofilm

Biofilme sind definiert als ortständige bakterielle Gemeinschaften, die von einer Matrix umschlossen sind und aneinander und/oder auf Oberflächen adhäreren. Bakterielle Biofilme stellen eine Wachstumsform dar, die sich vom planktonischen Wachstum deutlich unterscheidet [29]. Sie kommen in der Natur ubiquitär vor und sind gekennzeichnet durch Variabilität und Heterogenität in Bezug auf Spezies, Zellverteilung, Adhärenz und Ernährungsbedingungen, wobei in der Natur Biofilme normalerweise aus gemischten Spezies bestehen [19]. Die Biofilmbildung läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst setzen sich die planktonischen Bakterien mit Hilfe von Adhäsinen auf einer Oberfläche fest. *P. aeruginosa* und *E. coli* benötigen dazu Flagellen und Pili, wie durch Tests mit Mutanten, die zur Biofilmbildung unfähig waren, herausgefunden wurde [23]. Die Bakterien können jedoch auch untereinander adhäreren und Biofilminseln bilden, ohne sich vorher auf einer soliden Oberfläche festzusetzen [23]. Im weiteren Verlauf verändern die Bakterien ihren Phänotyp. Sie verlieren ihre Geißeln und beginnen verstärkt mit der Produktion einer hochhydratisierten Matrix aus extrazellulären polymerischen Substanzen, die hauptsächlich aus Exopolysacchariden (EPS) bestehen, sowie zusätzlich aus Proteinen, Nukleinsäuren und Phospholipiden [84]. Bei *P. aeruginosa* ist der Hauptbestandteil das Lipopolysaccharid Alginate [83]. Es wurde gezeigt, daß schon kurz nach der Adhärenz von *P. aeruginosa* Gene aktiviert werden, die die Produktion von Alginate hoch regulieren [25]. Durch Teilung in Zell-Cluster beginnen die Bakterien Mikrokolonien zu bilden die völlig in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind [44]. Die Matrix gibt dem Biofilm die nötige Stabilität. Sie ist gelartig und viskoelastisch, wodurch der Biofilm auf mechanische Beanspruchungen reagieren kann [83]. Auf diese Weise beginnt der Biofilm zu reifen und Strukturen auszubilden (s. Abb. 2).

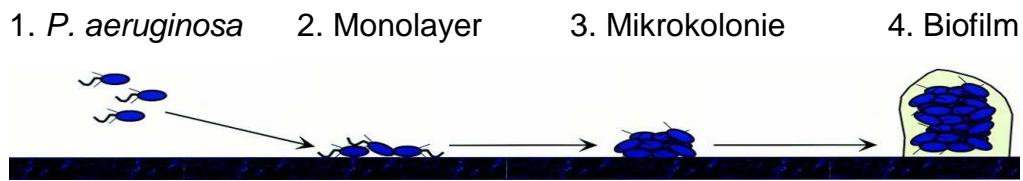


Abb. 2: Biofilmbildung von *P. aeruginosa*:

- 1. Planktonische *P. aeruginosa* bewegen sich auf eine Oberfläche zu**
- 2. Die Bakterien adhären auf der Oberfläche und bilden eine Schicht**
- 3. Durch Zellteilung bilden sich Mikrokolonien**
- 4. Durch die Produktion von EPS entsteht Biofilm**

Modifizierte Grafik aus [23], mit freundlicher Erlaubnis der Autoren.

Mit Hilfe des konfokalen Scanning Laser Mikroskops [54] ist es gelungen, die Strukturen von Biofilmen lebender Bakterien zu untersuchen. Reifer *P. aeruginosa*-Biofilm, der künstlich auf einer Oberfläche mit Hilfe eines Fließsystems erzeugt wird und bis zu 100 µm dick sein kann, bildet pilz- und pfeilerartige Makrokolonien, in denen die zusammenhängenden Mikrokolonien, die die Grundeinheiten des Biofilms darstellen, durch Wasserkanäle unterteilt sind (s. Abb. 3). In der CF-Lunge bildet *P. aeruginosa* jedoch ovale Makrokolonien, die wie Inseln im Mukus lokalisiert sind (s. Abb. 4).

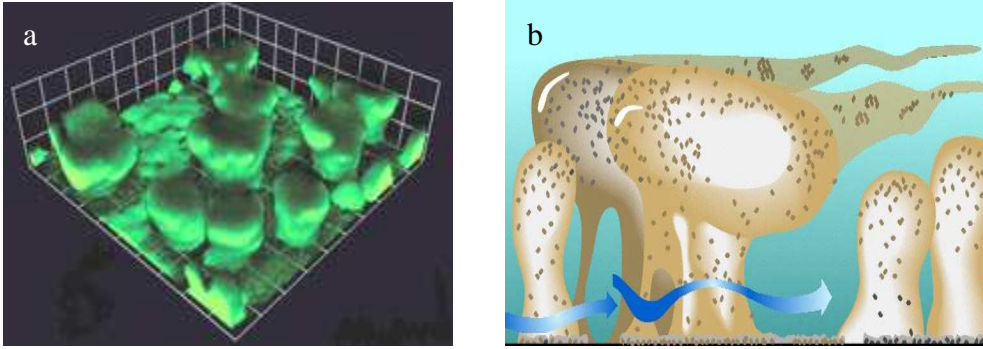


Abb. 3 a, b: *P. aeruginosa*-Biofilm: Abb. 3 a: Reifer, künstlich erzeugter Biofilm von *P. aeruginosa*, bestehend aus pilzartigen Makrokolonien [41], mit freundlicher Erlaubnis des Autors. Abb. 3 b: Schematische Darstellung eines reifen Biofilms von *P. aeruginosa* mit pilzartigen Makrokolonien und Wasserkanälen. Aus dem Internet (<http://www.erc.montana.edu>) mit freundlicher Erlaubnis des MSU Center for Biofilm Engineering, NSF Engineering research center, Montana State University, Bozeman, Montana, USA.

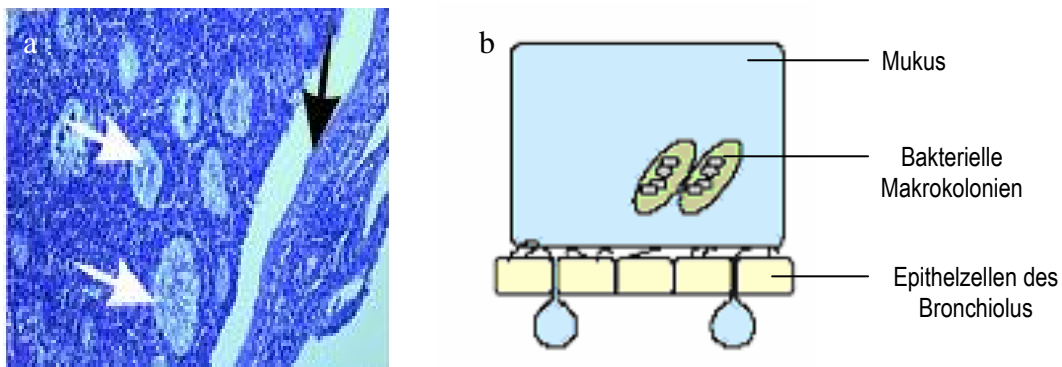


Abb. 4 a, b: *P. aeruginosa*-Biofilm in den Bronchioli eines CF-Patienten. Die bakteriellen Makrokolonien (weiße Pfeile) sind intraluminal im Mukus lokalisiert. Zu beachten ist die Abwesenheit von *P. aeruginosa* an der Oberfläche der Epithelzellen (schwarzer Pfeil). Modifizierte Grafiken aus [96], mit freundlicher Erlaubnis der Autoren.

Eine Erklärung für die Persistenz von mukoiden Keimen in der CF-Lunge bietet die Entdeckung, daß die EPS-Matrix die Keime vor den Granulozyten, welche die Immunreaktion dominieren, schützt. Dies geschieht, indem sie die Oberfläche der Keime für die Granulozyten unzugänglich macht und damit die Phagozytose der Keime durch die Granulozyten verhindert [11]. Auch die extrazellulären Abwehrsubstanzen der Granulozyten wie reaktive Sauerstoffmoleküle, proteolytische Enzyme und andere antimikrobielle Proteine scheinen durch die EPS-Matrix in ihrer Wirkung deutlich abgeschwächt zu werden. Die permanente Freisetzung dieser Substanzen führt jedoch zu einer chronischen Entzündungsreaktion, wobei die Keime selbst nicht endgültig eliminiert werden können [30].

Die erhöhte Resistenz von Biofilmbakterien gegen Antibiotika, die bis zu tausendfach höher sein kann als die von planktonischen Bakterien [40], ist ein wesentliches Problem bei der Behandlung von Infektionen, bei denen Biofilmbakterien vorkommen. Die bekannten Resistenzmechanismen einzelner Zellen wie Impermeabilität der Bakterienwand, Effluxpumpen, enzymatische Inaktivierung der Antibiotika oder Veränderungen des antibiotischen Angriffsziels [71] spielen hier sicherlich eine Rolle, denn durch biofilmspezifische Veränderungen in der Genregulation oder durch die erleichterte Weitergabe von Resistenzgenen sind Biofilmbakterien gegenüber planktonischen Bakterien möglicherweise im Vorteil bei der Anwendung dieser Mechanismen [82]. So ist bekannt, daß Bakterien in Biofilmen Effluxpumpen oder Membranproteine anders exprimieren als planktonische Bakterien [59]. Bestimmte Stoffwechselsysteme können protektive Schutzmechanismen durch gezielte Aktivierung von Genen triggern [82]. Jedoch gibt es auch Hypothesen, die biofilmspezifische Faktoren für eine erhöhte Resistenz verantwortlich machen. So ist bekannt, daß die EPS-Matrix die Diffusion von Antibiotika behindern kann, wobei manche Antibiotika den Biofilm gut penetrieren können, andere kaum, was abhängig von Antibiotika und Biofilm ist [20]. Mathematische Modelle sagen vorher, daß Biofilme eine gute Diffusionsbarriere bilden, wenn das Antibiotikum in den äußeren Schichten des Biofilms deaktiviert wird, bevor es vollständig diesen penetrieren kann [81]. Dieses Modell ist durch praktische Studien untermauert worden [2]. Auch veränderte Um-

weltbedingungen können für eine schlechtere Wirkung der Antibiotika verantwortlich sein. So bestehen in Biofilmen Konzentrationsgradienten von metabolischen Substraten und Produkten, weshalb in Biofilmen Zellen existieren, die kaum oder gar nicht wachsen [63]. Die Wirksamkeit bestimmter Antibiotika, wie z.B. β -Lactam-Antibiotika, ist unter solchen Bedingungen verringert, da diese auf das Wachstum von Bakterien angewiesen sind. Eine andere, spekulative Hypothese geht davon aus, daß eine Subpopulation von Bakterien einen speziellen, hochgeschützten, sporenähnlichen Phänotyp bildet, der nicht mutationsbedingt ist, aber diese Bakterien vor Antibiotika schützt [56]. Diese Hypothese könnte eine Erklärung bieten für die Tatsache, daß auch dünne Biofilme gegen Antibiotika resistenter sind als planktonische Bakterien [14].

1.5 Therapie von CF-Lungeninfektionen

Die effektivste Therapie zur Bekämpfung der Lungeninfektionen bei CF ist momentan die Antibiotikatherapie. Es gibt verschiedene Arten der Verabreichung der Antibiotika: sie können oral, intravenös oder als Aerosol über die Atemwege gegeben werden. Als oral wirksames Mittel hat sich das Chinolon Ciprofloxacin erwiesen [37]. Um Nebenwirkungen zu vermeiden und um hohe Konzentrationen des Wirkstoffs im Respirationstrakt zu erreichen, werden Antibiotika als Aerosole verabreicht. Häufig wird das Aminoglykosid Tobramycin verwendet [74; 94], andere gebräuchliche Aerosol-Antibiotika sind das Polypeptid Colistin und das Aminoglykosid Amikazin [48]. Intravenös werden vor allem Penicilline, Cephalosporine (z.B. Ceftazidim) Carbapeneme (z.B. Meropenem) und Aminoglykoside verabreicht [31]. Ferner scheinen Makrolidantibiotika (z.B. Azithromycin) den Verlauf der Lungenentzündung günstig zu beeinflussen [34]. Da die immer wieder auftretenden akuten Schübe chronischer Lungeninfektionen bei CF-Patienten häufige Antibiotikatherapien erfordern, besteht die Tendenz zu Resistenzentwicklungen und dem zunehmenden Versagen der Antibiotikatherapie [30]. Da nun das Immunsystem trotz der unterstützenden Antibiotikatherapie nicht in der Lage ist, mukoide Bakterien vollständig zu eradizieren, bedeutet dies letztendlich, daß das Fortschreiten der Lungeninfektion, verbunden mit

einer fortlaufenden Verschlechterung der Lungenfunktion, die zum Tod der Patienten führt, durch die Antibiotikatherapie nur hinausgezögert werden kann.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die in dieser Arbeit verwendeten Erreger werden in Antibiotikatests normalerweise planktonisch aerob kultiviert. Die vorangegangene Darstellung macht jedoch klar, daß zukünftige chemotherapeutische Strategien zur Bekämpfung bakterieller Lungeninfektionen bei CF anaerobe Bedingungen und Biofilmbildung berücksichtigen sollten. In dieser Arbeit sollte zum ersten Mal die quantitative Wirksamkeit von Antibiotika (Meropenem, Ciprofloxacin, Ceftazidim, Tobramycin) gegen bakterielle Erreger (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia*, *E. coli*) von CF-Lungeninfektionen unter anaeroben Bedingungen getestet werden. Weiterhin sollte ein Test zur Bestimmung der Aktivität von Antibiotika gegen Bakterien in Biofilm etabliert werden. Zudem sollten die Ergebnisse der Biofilmtests mit den Tests unter anaeroben Bedingungen verglichen werden. Schließlich sollte noch das Potential des Antibiotikums Azithromycin und einer DNA-Hydrolase, die Bildung von Biofilm zu inhibieren, erforscht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von Bakterienkulturen

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [46] sowie zu Vergleichszwecken *Staphylococcus aureus* ATCC 35556, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 und *Escherichia coli* ATCC 8739 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA)

Die Bakterien wurden auf Blutagarplatten (Columbia Blutagarplatte mit 10% Hammelblut, Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg) angezüchtet. Dazu wurde aus einer Gefrierkultur (s. u.) mit einer ausgeglühten Platinöse etwas Material entnommen und auf der Blutagarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert (Memmert Modell 700, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach). Mit Hilfe dieser Platten wurden flüssige Übernachtkulturen (ÜK) hergestellt. Dazu wurde ein sterilisiertes Glasröhrchen mit 5 ml sterilem Tryptone Soya Broth-Nährmedium (TSB, Oxoid, Basing Stoke, Hampshire, UK) befüllt, das in einem Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“, PBS) mit einem pH von 7 gelöst und mit 1% steril filtrierter Glucose (Merck KGaA, Darmstadt) versehen war. Von einer Blutagarplatte wurde eine Bakterienkolonie mit einer ausgeglühten Platinöse abgehoben und diese in das Nährmedium getaucht. Die ÜK wurden von Einzelkolonien der Platte hergestellt und nicht direkt von der Gefrierkultur, um zusätzliche Sicherheit vor Kontaminationen zu haben. Zusammen mit einer Wachstumskontrolle wurden die Bakterien bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute für 24 h inkubiert (Schüttelbrutschrank Infors HT, München). Aus dieser ÜK konnte wiederum eine Gefrierkultur hergestellt werden, indem 1 ml mit 100 µl Glycerin (Merck) versetzt und dann bei –80°C tiefgefroren wurde. Die ÜK wurde in einer Küvette (Sarstedt AG & Co., Nürnberg) 1:100 mit TSB verdünnt und mit Hilfe eines Photospektrometers (Ultrospec III, Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK) die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Mit Hilfe dieses Ergebnisses wurde die ÜK auf den Standardwert einer OD von 0,05 verdünnt. Diese verdünnten Kulturen wurden sowohl für die Erstellung anaerober Wachstumskurven (s.

unten) als auch zum Testen von planktonisch kultivierten Bakterien auf Antibiotika (s. S. 13) wie auch zur Herstellung von Biofilm verwendet (s. S. 15).

2.2 Erstellen von Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen

Anaerobe Wachstumskurven wurden erstellt, um festzustellen, ob die verwendeten Bakterien im anaeroben Milieu überlebten, damit sie für die Testung von Antibiotika unter anaeroben Bedingungen verwendet werden konnten (s. S. 13). Mengen von 5 ml der auf eine OD von 0,05 verdünnten ÜK (s. S. 11) wurden in sterilisierte Glasröhrchen überführt. Diese wurden in einen Anaerobiertopf (Merck) gestellt, der mit einem Reagenz zur Erzeugung eines anaeroben Milieus (Anaerocult, Merck) versehen war. Auf diese Weise wurden vier Anaerobiertöpfe gefüllt und in den Brutschrank gestellt. Die Bakterien wurden bei 34°C, einer Temperatur, die in den Bronchien der menschlichen Lunge herrscht, inkubiert [61]. Alle 24 h wurde ein Anaerobiertopf dem Brutschrank entnommen und die Bakterienzahl ermittelt. Mit diesen Ergebnissen wurde eine Wachstumskurve der Bakterien unter anaeroben Bedingungen über 4 Tage erstellt. Dem Zeitpunkt Null entsprach die Bakterienzahl der anfangs angesetzten verdünnten Bakteriensuspension. Die Bakterienzahl wurde mit Hilfe eines Plattenverdünnungstests ermittelt. Dazu wurde zunächst eine bebrütete Bakteriensuspension in Zehnerschritten verdünnt. Dann wurden zehn sterile Plastikröhrchen (15 ml Polypropylen-Röhrchen steril, Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit 900 ml PBS gefüllt. In das erste mit 900 ml PBS befüllte Röhrchen wurden mit einer Pipette 100 ml der Bakteriensuspension überführt und vermischt. Von dieser 1:10 Verdünnung wurden wiederum 100 ml in das nächste mit 900 ml PBS befüllte Röhrchen überführt und vermischt, womit eine Verdünnung der ÜK von 1:100 hergestellt worden war. Dies wurde schrittweise fortgeführt, bis eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 10^1 - 10^{10} hergestellt worden war. Von jeder Verdünnung wurden 2 mal 10 µl als Tropfen auf eine Blutagarplatte aufgetragen, die in Quadrate unterteilt war (schematische Darstellung s. S. 22, Abb. 7, Spalte C, Bild IV). Die Blutagarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wuchsen Kolonien bildende Einheiten (KBE) heran, von denen

jede ein Bakterium aus der aufgetropften Suspension repräsentierte. Am nächsten Tag wurde die geringste Verdünnung ermittelt, bei der einzeln auszählbare Bakterienkolonien zu sehen waren. Daraus wurde die Menge der Bakterien in KBE/ml bestimmt. Dazu wurde die Anzahl der Kolonien der zwei Felder durch zwei geteilt, mit Hundert multipliziert (da lediglich 10 µg auf die Felder pipettiert wurden, jedoch die Anzahl der Bakterien pro Milliliter ermittelt werden sollte) und dann mit dem umgekehrten Wert der Verdünnungsstufe multipliziert (also z.B. bei einer Verdünnung von 10^{-6} mit 10^6). Diese Zahl repräsentierte die Anzahl der Bakterien in KBE/ml.

2.3 Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen planktonisch aerob und anaerob kultivierte Bakterien

Folgende Antibiotika wurden verwendet: Das Carbapenem Meropenem (Astra Zeneca Pharmaceuticals LP, Willmington, USA), das Chinolon Ciprofloxacin (Ciprobay, Bayer AG, Leverkusen), das Cephalosporin Ceftazidim (Fortum, GlaxoWellcome GmbH & Co., Bad Oldesloe) und das Aminoglykosid Tobramycin (Gernebcin, Lilly GmbH, Gießen).

Die Wirksamkeit der Antibiotika wurde in Anlehnung an NCCLS Standards (NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA) getestet. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Antibiotika hergestellt. Es wurde eine Stammlösung des Antibiotikums mit einer Konzentration von 10,24 mg/ml, dem 10-fachen der endgültigen Höchstkonzentration, angesetzt und diese in Zweiserschritten in TSB+Glucose fortlaufend verdünnt. Dazu wurden Plastikröhrchen (Cellstar, Greiner) mit 1 ml Nährmedium befüllt, in das erste Röhrchen 1 ml Antibiotika-Stammlösung pipettiert und vermischt, womit eine Verdünnung der Stammlösung von 1:2 hergestellt worden war. Von dieser Verdünnung wurde 1 ml in das nächste Röhrchen pipettiert und vermischt, womit eine Verdünnung der Stammlösung von 1:4 hergestellt worden war. Auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe der Antibiotika in Zweiserschritten von Konzentration von 10,24 mg/ml bis 0,16 µg/ml hergestellt.

Für die aerob ermittelten MBKs wurden jeweils 0,5 ml der Antibiotikumlösung mit 4,5 ml einer Bakteriensuspension mit einer OD von 0,05 (s. S. 11) vermischt und damit um das Zehnfache verdünnt, so daß die Bakterien Endkonzentrationen der Antibiotika von 1024 µg/ml bis zu 0,016 µg/ml ausgesetzt waren. Diese Gemische wurden über Nacht für 24 h bei 34°C und 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert und dann auf Blutagarplatten ausplattiert, um die Zahl der überlebenden Bakterien zu ermitteln (s. S. 12). Als ausreichend wirksame Konzentration wurde die minimale bakterizide Konzentration (MBK) benutzt. Sie wurde als die Antibiotikakonzentration definiert, bei der im Vergleich zur Kontrollkonzentration ohne Antibiotikum mehr als 99,9% Bakterien abgetötet wurden.

Um die Wirksamkeit der Antibiotika unter anaeroben Bedingungen zu testen, wurden zunächst wie oben beschrieben Verdünnungsreihen der Antibiotika und Suspensionen der Bakterien mit einer OD von 0,05 vorbereitet, diese dann in eine Anaerobierkammer eingeschleust (Anaerobic Chamber, Coy Toepffer Lab Systems, Göppingen) und erst dann unter anaeroben Bedingungen (0% O₂, 2% H₂, 98% N₂) wie oben beschrieben gemischt. Dieses Vorgehen war nötig, da die Antibiotika unmittelbar nach der Vermischung mit den Bakterien zu wirken begannen. Danach wurden die Glasröhrchen in der Kammer in einen Anaerobiertopf (Merck) überführt, dieser luftdicht verschlossen, ausgeschleust, über Nacht bei 34°C in den Brutschrank gestellt und am nächsten Tag die Bakterienzahl (s. S. 12) ermittelt.

Bei der Testung von Meropenem auf PAO1 unter anaeroben Bedingungen wurde außerdem die Wirkung von Meropenem auf Bakterien mit einem großen Nitratangebot getestet, da dann die Bakterien besser wuchsen (s. S. 4). Dazu wurde dem Nährmedium Nitrat in einer Konzentration von 100 mM zugegeben. Auf diese Weise sollte getestet werden, inwiefern sich die Wirkung von Meropenem unter anaeroben Bedingungen verändert, wenn die Bakterien besser wachsen, um festzustellen ob die Wachstumsrate ein entscheidender Faktor für die Wirkung von Meropenem auf PAO1 unter anaeroben Bedingungen ist.

2.4 Durchführung eines Biofilmtests

2.4.1 Biofilmbildung

Für die Bildung von Biofilm (s. S. 21, Abb. 6) wurde in dieser Arbeit ausschließlich PAO1 verwendet. Die Näpfcchen einer 96-Wellplatte (MicroWell™-Platten aus Polystyrol, Nunc) wurden mit 200 µl einer 0,01%-Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) befüllt. Eine 96-Zapfenplatte (Nunc Immuno TSP aus Polystyrol, steril, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) wurde über die Wellplatte gestülpt, so daß die Zapfen von der Lösung umspült wurden. In diesem Zustand wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Zapfen mit Poly-L-Lysin zu beschichten. Eine Übernachtskultur von PAO1 wurde auf eine OD von 0,05 (s. S. 11) verdünnt und für 3 h im Schüttelbrutschrank bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute bebrütet, um eine Bakteriensuspension mit einer OD von ca.1 zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurde vermutet, daß die Bakterien in dieser Phase besonders gut adhäreren, da sie in dieser Phase Adhäsine bilden. Von der 3 h-Kultur wurden 200 µl in die Näpfcchen einer 96-Wellplatte überimpft. Über diese Platte wurde die mit Poly-L-Lysin beschichtete Zapfenplatte gestülpt, so daß die Zapfen von der 3 h-Kultur umspült wurden. Die Platte wurde dann auf einem Schüttler (IKA-VIBRAX-VXR, Janke & Kunkel, Staufen) mit Klebeband befestigt und für 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und mit 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. In dieser Zeit bildeten die Bakterien an den Zapfen Biofilm. Danach wurden die Zapfen mit PBS gewaschen, indem die Zapfenplatte über eine 96-Wellplatte, deren Näpfcchen mit 200 µl PBS gefüllt waren, gestülpt und vorsichtig für 1 min gerüttelt wurde. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt.

2.4.2 Nachweis der Biofilmbildung

Mit Hilfe mehrerer Methoden wurde nachgewiesen, daß sich an den Zapfen Biofilm bildete.

a) Lichtmikroskop

Der Biofilm an den gewaschenen Zapfen wurde mit Safranin, das die Zellwände gramnegativer Bakterien anfärbt, rot gefärbt. Dazu wurden die Näpfchen einer 96-Wellplatte mit 200 µl 1%-Safraninlösung (Merck) befüllt und die Zapfenplatte für 30 sec darübergestülpt. Die gefärbten Zapfen wurden anschließend in PBS gewaschen und fotografiert (DC 290, Kodak, Stuttgart). Anschließend wurde etwas Biofilm mit einer Injektionsnadel (Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mechanisch abgelöst, auf einen Objektträger (R. Langenbrink, Emmendingen) mit einem Tropfen destilliertem Wasser verteilt und nach dem Trocknen unter dem Lichtmikroskop (AxioPlan, Carl Zeiss, Jena) bei tausendfacher Vergrößerung betrachtet und fotografiert (AxioCam, Zeiss).

b) Rasterelektronenmikroskop

Einige Zapfen mit Biofilm wurden mit einer chirurgischen Klemme abgebrochen, in 2,5%-Glutaraldehyd (Glutaraldehyde Grade 1, 25% Aqueous Solution, Sigma, in Aqua dest. 1:10 verdünnt) über Nacht im Kühlschrank fixiert, dann dreimal in PBS gewaschen und bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die fixierten Zapfen wurden direkt in Osmiumtetroxid (OsO_4 1%, Sigma) auf Eis für 1 h nachfixiert, danach fünfmal in einfachem PBS gewaschen, mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydratisiert (70%, 80%, 96%, 100% Ethanol, Merck), getrocknet bis zum kritischen Punkt und mit Gold-Palladium (200 Å) besputtert. Die besputterten Zapfen wurden anschließend unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

c) Indirekte Immunfluoreszenz

Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde das von PAO1 erzeugte Alginat sichtbar gemacht und der von PAO1 erzeugte Biofilm nachgewiesen. Von einem Zapfen mit Biofilm wurde mit einer Injektionsnadel Biofilm abgekratzt, auf einem Objektträger in einem Tropfen Aqua dest. verteilt und getrocknet. Dieser Bereich wurde mit einem Silikonstift (DAKO Pen, Code No. 2002, DAKO) umfahren, um einen Wasser abweisenden Randwall zu erzeugen. Zunächst wurden mit einer Pipette 20 ml einer 4%-Formaldehydlösung (Merck) zur Fixierung für 5 min aufgetragen und abgesaugt. Danach wurde mit einer Spüllösung gewaschen (3x5 min mit PBS +0,1% Tween, Tween 20, Sigma), wie nach jedem der folgenden Schritte. Dann wurde für 30 min Schweineserum (Schweineserum normal, DAKO), in PBS/Tween 1:10 verdünnt, aufgetragen. Anschließend wurde für 60 min ein Kaninchen-Anti-Alginat-Antikörper, in PBS/Tween 1:50 verdünnt, aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (DAKO), der gegen den Kaninchen-Anti-Alginat-Antikörper gerichtet war, für 60 min unter Lichtabschluß aufgetragen. Dieser Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper war mit dem rot fluoreszierenden Fluorochrom Indocarbocyanin-3 konjugiert. Schließlich wurde für 5 min der Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma), 1:500 in PBS/Tween verdünnt, aufgetragen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Objektträger getrocknet und das Präparat mit fluorescent mounting medium (DAKO) eingedeckt, indem ein Streifen des Mediums auf einem Deckglas aufgebracht und damit der Objektträger abgedeckt wurde. Das Präparat wurde über Nacht getrocknet und danach unter einem Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan, Zeiss) bei hundertfacher Vergrößerung untersucht, fotografiert (AxioCam, Zeiss) und mit dem Computer ausgewertet (AxioVision 3.1, Zeiss).

2.4.2 Lebendkeimnachweis im Biofilm mit Hilfe eines Vitalitätstests

Von einem Zapfen wurde Biofilm mit einer Nadel abgekratzt und in PBS abgestreift. Die Bakterien wurden mit einem Fluoreszenzgemisch aus SYTO[®] 13 und Propidiumiodid angefärbt. Das Gemisch wurde folgendermaßen hergestellt: 4 µl SYTO[®] 13 (5 mM gelöst in DMSO, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) und 4 µl Propidiumiodid (1mg/ml gelöst in Aqua dest., Molecular Probes) wurden in 2 ml PBS verdünnt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml Safe-Lock-Tubes, Eppendorf-Nettheihe-Hinz GmbH, Hamburg) überführt, bei 5000 UPM für 5 min zentrifugiert (3 K 10, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz), der Überstand abgesaugt, dem übrig bleibenden Bakterienpellet 100 µl Fluoreszenzgemisch zugesetzt, das Ganze vermischt und für 30 min bei 37 °C unter Lichtabschluß inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen wurde dem gefärbten Pellet 100 µl 5% Glutaraldehyd zur Fixierung zugesetzt, das Ganze vermischt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde das Eppendorfgefäß wieder zentrifugiert und abgesaugt, 100 µl PBS hinzugefügt, vermischt und die Bakterien auf diese Weise dreimal gewaschen, danach das endgültige Pellet in 100 µl Aqua dest. aufgelöst, ein Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht, getrocknet, mit fluorescent mounting Medium eingedeckt und am nächsten Tag mit hundertfacher Vergrößerung mikroskopiert (Axioplan), fotografiert (AxioCam) und mit dem Computer ausgewertet (AxioVision 3.1). Zur Demonstration der Methode wurden sowohl lebende als auch mit 5% Natriumazid (Merck) abgetötete planktonische PAO1 angefärbt und im Mikroskop dargestellt. Lebende und tote Bakterien wurden durch SYTO[®] 13 markiert und leuchteten daraufhin durch den Grünfilter des Mikroskops grün, nur die toten Bakterien wurden zusätzlich durch Propidiumiodid markiert und leuchteten zusätzlich durch den Rotfilter rot.

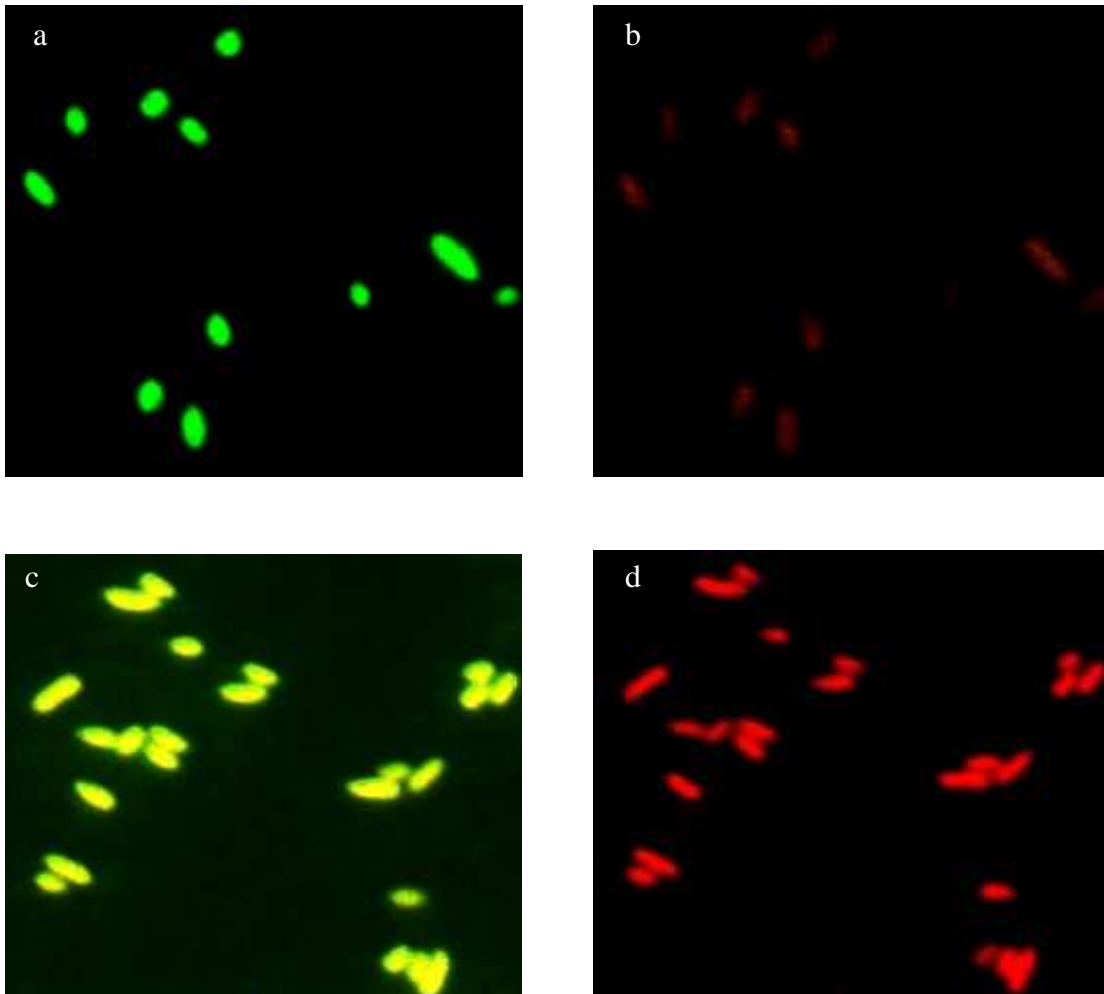


Abb. 5, a-d: Demonstration der Vitalitätsfärbung an planktonischen *P. aeruginosa*. Bakterien wurden einer Übernachtkultur entnommen und entweder sofort lebendig gefärbt (a, b); oder erst gefärbt, nachdem sie mit Natriumazid abgetötet worden waren (c, d). Sowohl lebende als auch abgetötete Bakterien leuchteten durch SYTO[®] 13 markiert durch den Grünfilter des Mikroskops grün (a, c). Tote Bakterien, zusätzlich mit Propidiumiodid markiert, leuchteten durch den Rotfilter des Mikroskops rot (d). Das grüne Leuchten der lebenden Bakterien wurde durch den Rotfilter nicht vollständig unterdrückt, deshalb ist in Abb. 5 b ein schwaches Leuchten erkennbar. Ebenso wurde das rote Leuchten der toten Bakterien durch den Grünfilter nicht vollständig unterdrückt, weshalb die toten Bakterien in Abb. 5 c heller leuchten als die lebenden in Abb. 5 a. Originalvergrößerung aller Abbildungen: 1000-fach.

2.4.3 Keimzahlbestimmung im Biofilm

Zur Keimzahlbestimmung (s. S. 23, Abb. 7) wurde der PAO1-Biofilm zunächst von den Zapfen abgelöst. Dazu wurde eine mit Biofilm beschichtete Zapfenplatte in die Nöpfchen einer 96-Wellplatte getaucht, die mit 200 µl eines Lösungsgemisches aus 0,1 M EDTA (Titriplex III, Merck), 0,1% CHAPS (Sigma) und 100 µg/ml Alginase (Alginat-Lyase from *Flavobacterium sp.*, Sigma) befüllt waren und für 60 min bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Dadurch wurde der Biofilm aufgelöst. Die im Nöpfchen entstehende Bakterien-suspension wurde ausplattiert. Dazu wurden Röhrchen (Standard PPN-tube-96, Micronic bv, Lelystad, Niederlande) mit einer Achtkanal-Pipette (Finnpipette Focus, Thermo Life Sciences, Dreieich) mit je 900 µl PBS gefüllt. In die erste Reihe wurden 100 µl der Lösung mit abgelöstem Biofilm gefüllt und dann in Zehnerschritten Verdünnungsreihen von 10^{-1} - 10^{-8} hergestellt. Ausplattiert wurde wie folgt (s. Abb. 7, Spalte C und D): Auf der Finnpipette wurden die Steckplätze nur abwechselnd bestückt, so daß immer ein leerer Steckplatz zwischen zwei besetzten Steckplätzen verblieb. Dann wurden je 10 µl von den Verdünnungen abgenommen - einmal die Verdünnungen: 10^1 , 10^3 , 10^5 , 10^7 und mit neuen Spitzen einmal die Verdünnungen 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 - und auf eine Blutagarplatte aufgetropft die in Quadrate für die Verdünnungen unterteilt war. Wären alle Kanäle der Finnpipette bestückt gewesen, dann wären die Tropfen auf der Platte zusammengefließen, was eine spätere Auszählung unmöglich gemacht hätte. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Die entstehenden KBE wurden wie beschrieben ausgezählt und die Bakterienzahl in KBE/ml berechnet (s. S. 12).

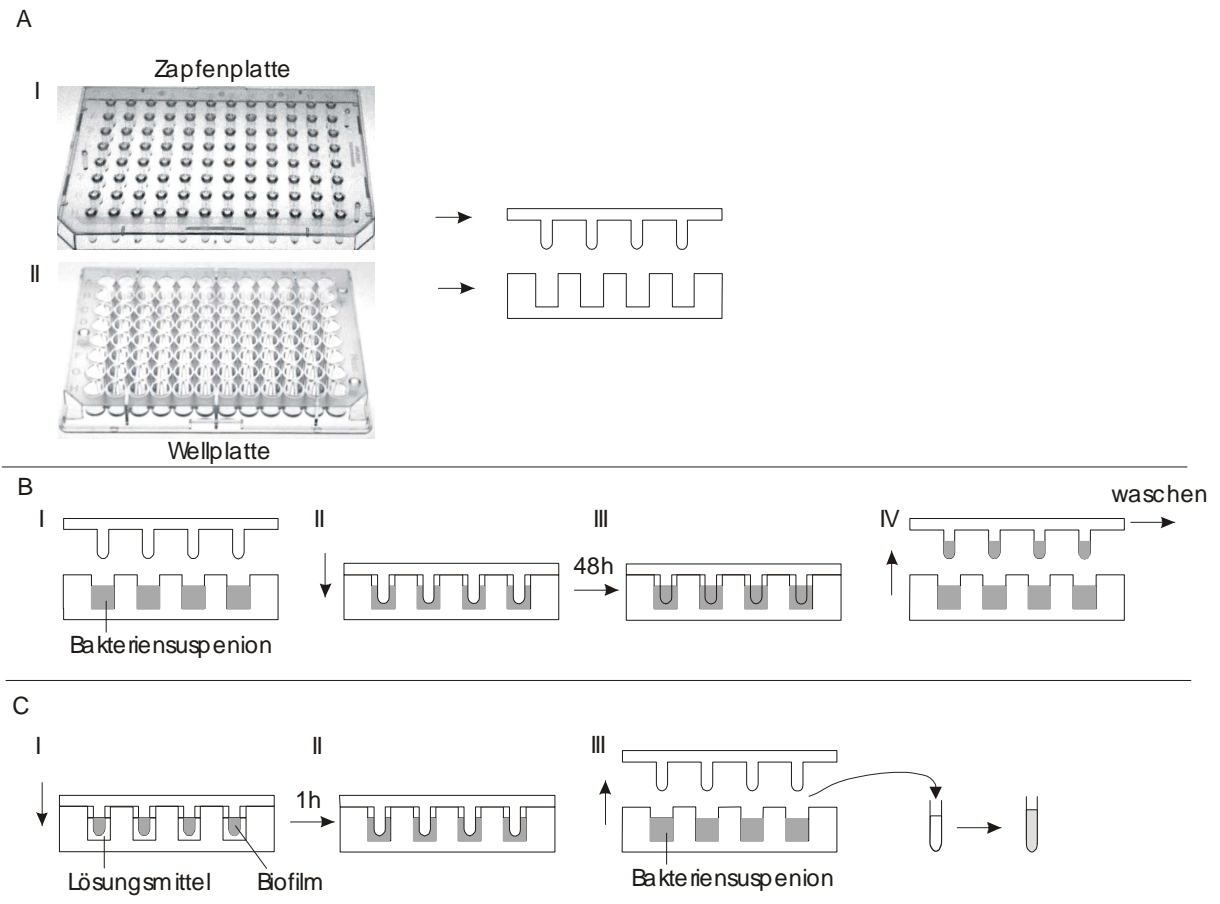


Abb. 6: Zapfenplattentest

Die Nöpfchen einer 96-Wellplatte wurden mit 200µl Bakteriensuspension befüllt und die mit Poly-L-Lysin beschichteten Zapfen einer Zapfenplatte hineingetaucht (A, B). Innerhalb einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C bildete sich an den Zapfen Biofilm. Die Zapfenplatte wurde nach dieser Zeit abgehoben und zweimal in PBS gewaschen. Dieser Biofilm konnte für die Antibiotikatests verwendet werden. Zum Ablösen des Biofilms wurden die gewaschenen Zapfen in ein Lösungsmittel getaucht. Innerhalb einer Inkubationszeit von 1 h bei 200 UPM und 37°C lösten sich die Bakterien von den Zapfen. Die so entstandene Bakteriensuspension wurde aus den Nöpfchen in Röhrchen überführt (C). Zur weiteren Verarbeitung s. Abb. 7.

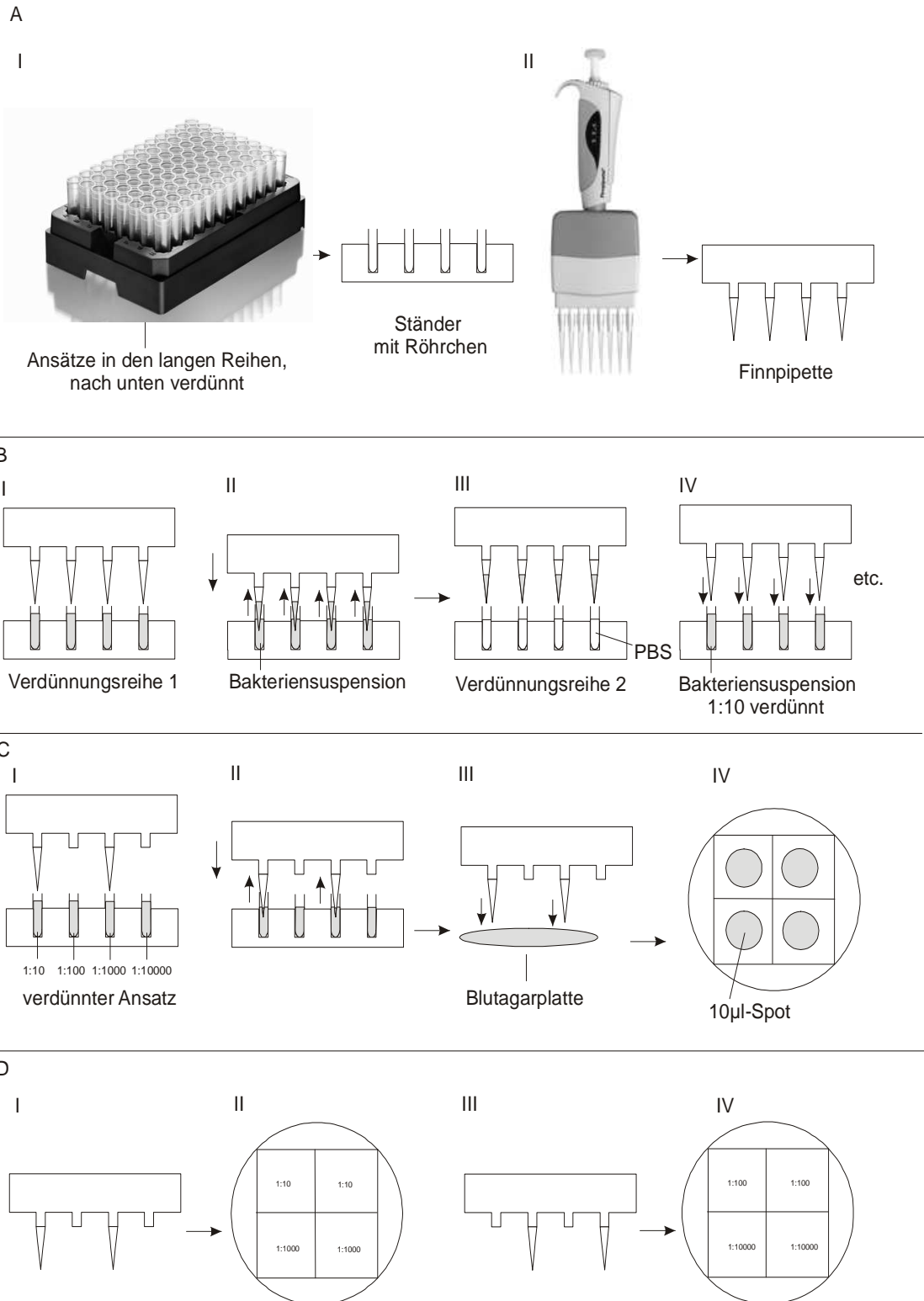


Abb. 7: Quantifikation der suspendierten Biofilm-Bakterien durch Verdünnen und Ausplattieren. Die Röhren eines Ständers wurden mit 900 µl PBS befüllt. Dann wurden in die Röhren der obersten langen Reihe 100 µl der abgelösten Bakteriensuspension pipettiert, dabei wurde von *einem*

Näpfchen in *ein* Röhrchen pipettiert. Diese erste Verdünnungsreihe wurde mit einer Finnpipette durchmischt, 100 µl abpipettiert, in die nächste Reihe pipettiert und durchmischt (A, B). Dies wurde schrittweise fortgeführt, bis die gewünschte Verdünnung erreicht worden war (pro Ständer max. 10^{-8}). Um die Verdünnungen auszuplattieren, wurde eine Achtkanal-Finnpipette so mit Spitzen bestückt, daß immer ein Steckplatz frei blieb. Zuerst wurden 10 µl der ungeraden Verdünnungen mit einer passend bestückten Pipette abpipettiert und auf eine Blutagarplatte aufgetropft, die in Quadrate für die Tropfen unterteilt war (C). Die Quadrate waren zudem auf der Rückseite der Platte mit den Verdünnungsstufen beschriftet. Als nächstes wurden 10 µl der geraden Verdünnungen mit einer passend bestückten Pipette abpipettiert und auf eine weitere Blutagarplatte aufgetropft (D).

2.4.4 Untersuchung der Wirksamkeit von Meropenem und Ciprofloxacin in Biofilm

Zuerst wurde Biofilm von PAO1 an einer Zapfenplatte hergestellt (s. S. 15). Als nächstes wurden Verdünnungsreihen von Antibiotika mit Meropenem und Ciprofloxacin hergestellt (s. S. 13), jedoch diesmal sofort mit der gewünschten Endkonzentration des Antibiotikums. Von jeder Konzentration einer Verdünnungsreihe wurden drei Näpfchen einer 96-Wellplatte mit je 200 µl befüllt. Die Zapfenplatte mit Biofilm wurde darüber gestülpt. Diese Platte wurde in einer feuchten Kammer über Nacht für 24 h bei 37°C inkubiert. Dazu wurde eine Metallbox mit feuchten Papiertüchern ausgelegt, die Platten hineingestellt und die Box mit einem Deckel verschlossen. Dies sollte ein Austrocknen der Näpfchen verhindern. Am nächsten Tag wurden die Zapfen zweimal mit PBS gewaschen, der Biofilm abgelöst, die Suspension ausplattiert (s. S. 20), und die Bakterienzahlen ermittelt. Die MBK wurde gemäß der Definition unter 2.2 festgelegt (s. S. 14).

2.5 Einfluß von Azithromycin und DNase auf die Biofilmbildung

Der Biofilmtest wurde leicht abgewandelt, um zu testen, ob sich mit bestimmten Substanzen die Bildung des Biofilms verhindern lassen konnte. Getestet wurden das Makrolid-Antibiotikum Azithromycin (Zithromax, Pfizer Inc. New York, USA) und eine DNA-Hydrolase (DNase, lyophilized powder, Type IV, minimum 2,000 Kunitz units/mg protein, Sigma). Für Azithromycin wurde beschrieben, daß es in subinhibitorischen Konzentrationen die Bildung von Alginate inhibiert [49]. Die DNase wurde benutzt aufgrund der Annahme, daß Bakterien bei der Bildung von Biofilm extrazelluläre DNA benötigen könnten [92]. Es wurde vermutet, daß DNase die Bildung des Biofilms behindert, indem sie die extrazelluläre DNA im Biofilm abbaut. Zunächst wurden Verdünnungsreihen von Azithromycin und DNase hergestellt (s. S. 13). Diese wurden mit der 3 h-Kultur von PAO1 um 1:10 verdünnt, so daß die gewünschten Endkonzentrationen der Substanzen erreicht waren. Von jeder Konzentration dieser Verdünnungsreihe wurden je 200 ml in drei Nöpfchen einer Wellplatte überführt und eine sterile mit Poly-L-Lysin beschichtete Zapfenplatte (s. S. 15) über die Wellplatte gestülpt. Die Platte wurde bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank auf einen Schüttler gestellt. Nach 48 h wurden die Zapfen gewaschen (s. S. 15), danach eventuell vorhandener Biofilm abgelöst (s. S. 20), die Lösung ausplattiert und die Bakterienzahlen ermittelt (s. S. 20). Die Effektivität der Wirksubstanz wurde folgendermaßen festgelegt: je geringer die Bakterienzahl im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirksubstanz war, desto effektiver war die Inhibition der Biofilmbildung.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum unter anaeroben Bedingungen

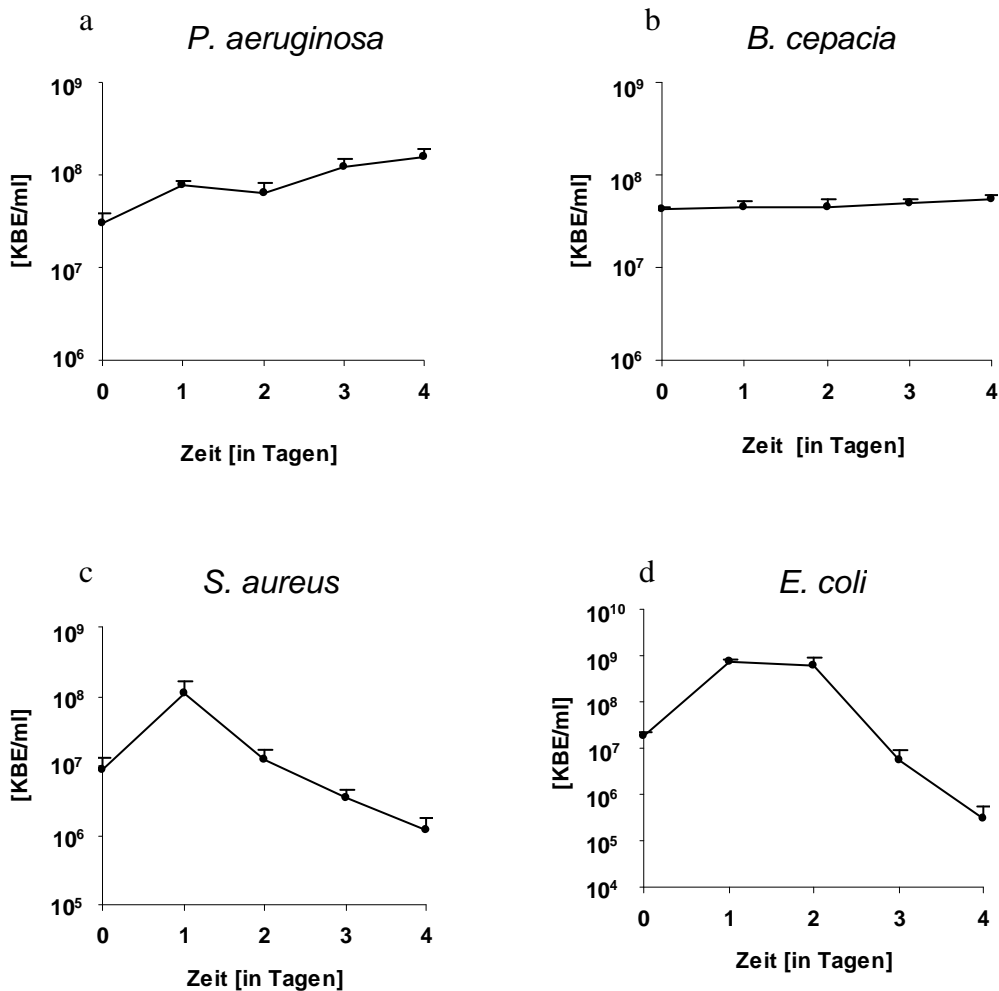


Abb. 8: Wachstumskurven von *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. aureus* und *E. coli* unter anaeroben Bedingungen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Bei *P. aeruginosa* zeigt sich ein geringfügiges Wachstum, bei *B. cepacia* zeigt sich kein erkennbares Wachstum, *S. aureus* wächst am ersten Tag und stirbt dann ab, *E. coli* wächst am ersten Tag, persistiert bis zum zweiten Tag und stirbt dann ebenfalls ab. Alle Werte als Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelwerten.

Bei *P. aeruginosa* zeigte sich unter anaeroben Bedingungen ein geringes Wachstum um knapp eine Zehnerpotenz über 4 Tage (Abb.1 a) von $3,03 \times 10^7$ auf $1,56 \times 10^8$ KBE/ml. Bei *B. cepacia* zeigte sich unter anaeroben Bedingungen kein erkennbares Wachstum über 4 Tage (b), zu Beginn lag die Bakterienzahl bei $4,18 \times 10^7$ KBE/ml, nach 4 Tagen bei $5,42 \times 10^7$ KBE/ml. Daß sich bei *P. aeruginosa* und *B. cepacia* nur wenig oder kein Wachstum zeigte, könnte darauf zurückgeführt werden, daß den Bakterien im verwendeten Medium (TSB) Elektronenakzeptoren zur Ersatzatmung nur in geringem Maß zur Verfügung standen. Bei *S. aureus* zeigte sich unter anaeroben Bedingungen ein Wachstum um ca. eine Zehnerpotenz von 9×10^6 auf $1,09 \times 10^8$ KBE/ml am ersten Tag, bis zum vierten Tag gingen die Bakterienzahlen jedoch um knapp 2 Zehnerpotenzen auf $1,22 \times 10^6$ KBE/ml zurück (c). Bei *E. coli* zeigte sich unter anaeroben Bedingungen ein Wachstum um 1-2 Zehnerpotenzen über die ersten 2 Tage von $1,85 \times 10^7$ auf $6,17 \times 10^8$ KBE/ml, bis zum vierten Tag gingen die Bakterienzahlen jedoch um ca. 3 Zehnerpotenzen auf $3,10 \times 10^5$ KBE/ml zurück (D). Alle Bakterien, zeigten am ersten Tag zumindest ein geringes Wachstum, *B. cepacia* persistierte. Damit war gesichert, daß die Bakterien unter anaeroben Bedingungen getestet werden konnten.

3.2 Bilder des Biofilms an der Zapfenplatte

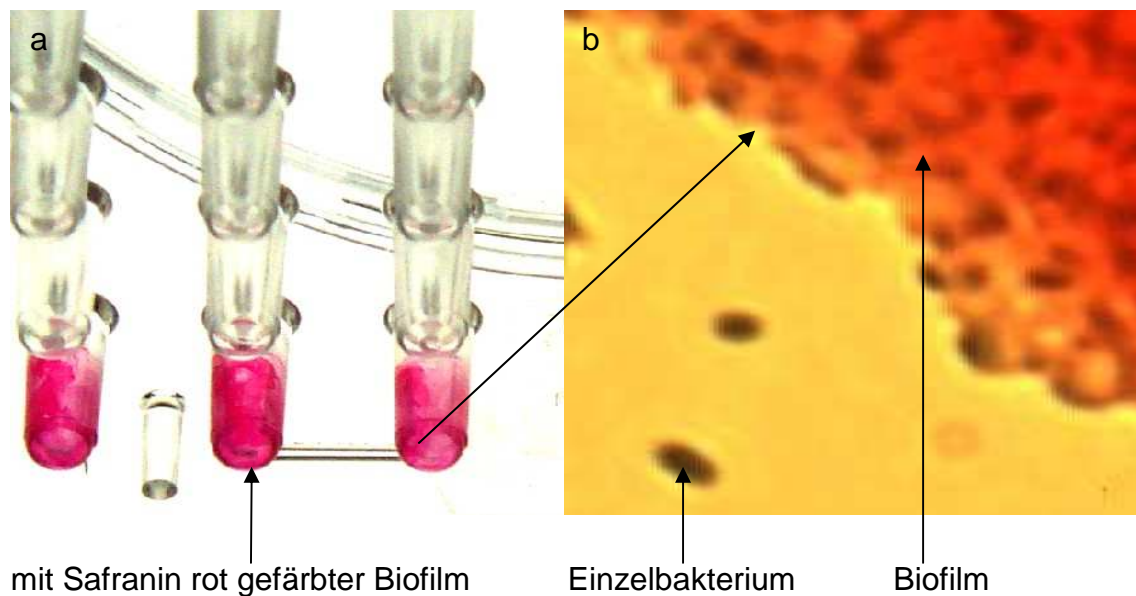


Abb. 9 a, b: Mit Safranin gefärbter Biofilm: An den gewaschenen Zapfen der Zapfenplatte (a) ist ein mit Safranin rot gefärbter Belag zu erkennen, das abgekratzte Material stellte sich unter dem Lichtmikroskop als bakterieller Zellverbund dar (b).

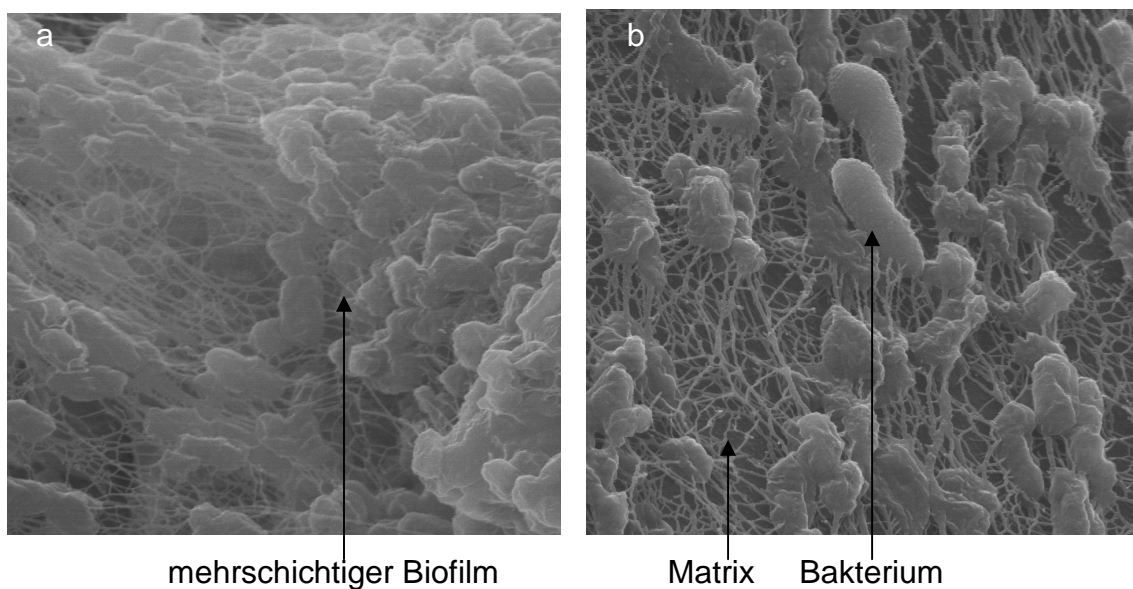


Abb. 10 a, b: Darstellung des Biofilms im REM. Es sind Bakterien zu sehen, die in eine fadenartige extrazelluläre Matrix eingebettet sind.

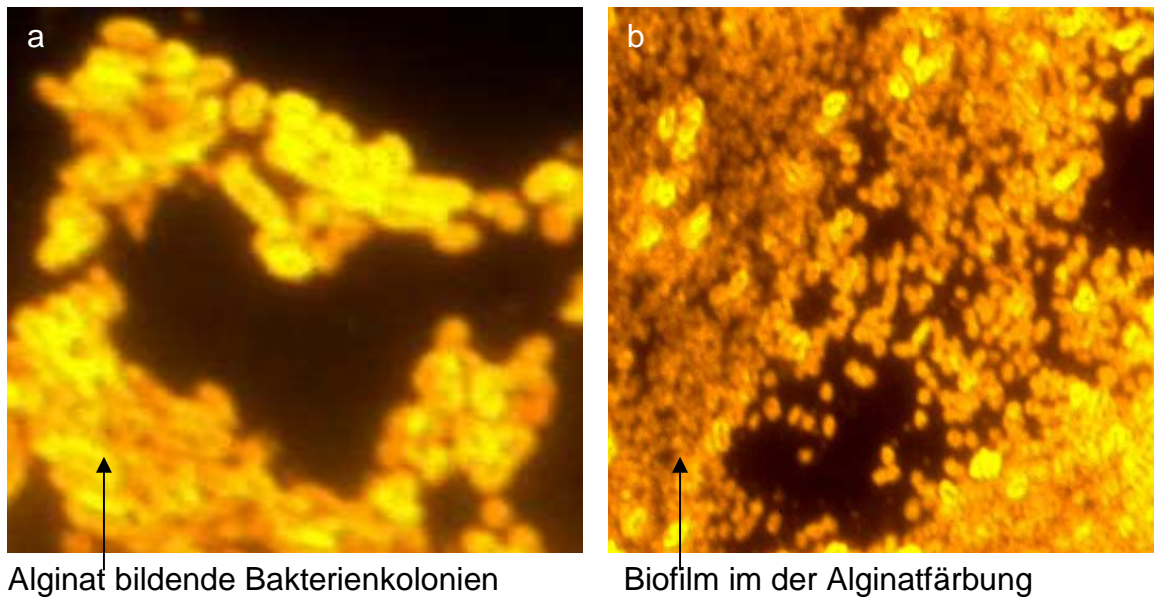
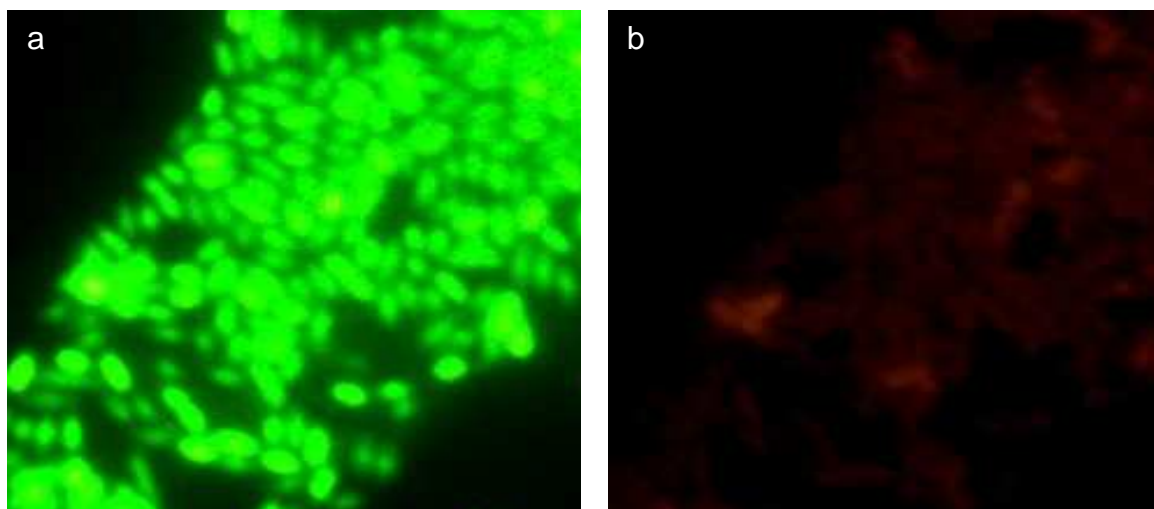


Abb. 11 a, b: Alginatfärbung: Hier zeigen sich **polygonale Anordnungen** von Alginat bildenden **Bakterienformationen**, (a), aber auch **größere, dickere Biofilmformationen** (b).



Zellverband im Grünfilter deutlich zu erkennen, im Rotfilter weitgehend negativ

Abb. 12 a, b: Vitalfärbung: Mit SYTO[®]13 (a) zeigte sich ebenfalls ein **Verband von Zellen**, die zum großen Teil durch Propidiumiodid (b) nicht angefärbt werden konnten, was bedeutet, dass die **überwiegende Zahl der Bakterien am Leben** waren (s. S. 19). Die Keimzahlbestimmung ergab aus 3 Einzelbestimmungen einen **Mittelwert von $2,33 \times 10^8$ ($\pm 5,77 \times 10^7$)**.

3.3 Keimzahlreduktionen der Bakterien durch Antibiotika

3.3.1 Wirkung von Meropenem auf *P. aeruginosa*

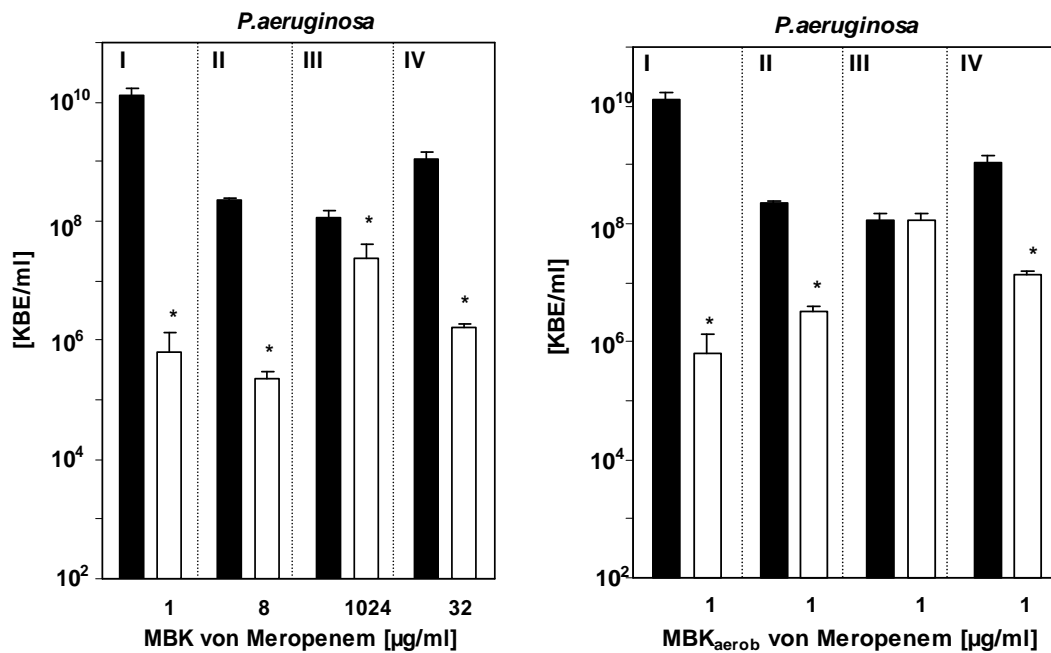


Abb. 13 a, b: Wirkung von Meropenem auf *P. aeruginosa*: Kultivierungen:
I = planktonisch aerob, II = Biofilm, III = planktonisch anaerob, IV = planktonisch anaerob mit Nitrat. **Schwarze Balken:** Bakterienzahl (in KBE/ml) der Kontrolle (K) ohne Antibiotikazugabe. **Weißer Balken:** in a) Keimzahlreduktion (in KBE/ml) unter Wirkung der jeweiligen MBK, in b) Keimzahlreduktion unter einer einheitlichen Konzentration, gewählt wurde die MBK unter aeroben Bedingungen. Die Werte der MBKs (in µg/ml) sind unter den weißen Balken angezeigt. Alle Bakterienzahlen als Mittelwert + Standardabweichung aus 3 Einzelwerten. Ermittlung der p-Werte durch den Student-t-Test, signifikant (*) bei Werten < 0,01 (s. Anhang S. 64). Diese Erläuterungen sind gültig für alle Diagramme des Kapitels 3.3.

Meropenem wirkte auf planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa* gut, bei einer MBK von 1 µg/ml ergab sich eine signifikante Reduktion von mehr als 4 Zehnerpotenzen (Abb. 13 a, I). Gegen *P. aeruginosa* im Biofilm verschlechterte sich die Wirkung. Hier wurden die Bakterien erst bei MBK von 8 µg/ml um 3 Zehnerpotenzen signifikant reduziert (Abb. 13 a, II) bei der aeroben MBK von

1 µg/ml ergab sich lediglich eine signifikante Reduktion um knapp 2 Zehnerpotenzen (Abb. 13 b, II). Bei planktonisch anaerob kultiviertem *P. aeruginosa* ließ sich kaum eine Wirkung von Meropenem feststellen. Bei einer Konzentration von 1024 µg/ml Meropenem ergab sich nur eine geringfügig signifikante Reduktion der Bakterienzahl um weniger als eine Zehnerpotenz (Abb. 13 a, III). Wurde jedoch Nitrat in hoher Konzentration dem Nährmedium zugegeben (100 mmol/L Nährmedium), verbesserte sich die Wirkung von Meropenem auf planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* wieder. Allerdings war die MBK mit einer Reduktion um 3 Zehnerpotenzen erst bei einer Konzentration von 32 µg/ml erreicht (Abb. 13 a, IV), bei der aeroben MBK von 1 µg/ml ergab sich lediglich eine signifikante Reduktion um 2 Zehnerpotenzen (Abb. 13 b, IV). Außerdem persistierte planktonisch anaerob kultivierter *P. aeruginosa*, der mit einer hohen KNO₃-Konzentration versorgt war, bei Konzentrationen von Meropenem weit über der MBK auf einem wesentlich höheren Niveau von (10⁶ KBE/ml) als planktonisch aerob kultivierte Bakterien (10³ KBE/ml, nicht gezeigt). Im direkten Vergleich zeigte sich eine deutliche Abnahme der Wirksamkeit des Antibiotikums in der Reihenfolge der Kultivierungen: planktonisch aerob, Biofilm, planktonisch anaerob, wobei sich die Wirkung auf planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* bei Verbesserung der Wachstumsbedingungen durch Nitratzugabe wieder erhöhte.

Während Meropenem gegen planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa* gut wirkt, verschlechtert sich seine Wirkung im Biofilm. Gegen planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* ist es unwirksam. Ist dem Nährmedium jedoch Nitrat zugesetzt zeigt sich eine bessere Wirkung auf planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa*, wobei diese schlechter ist als die Wirkung unter aeroben Bedingungen. Somit zeigt sich eine schrittweise Verschlechterung der Wirksamkeit in der Reihenfolge der Kultivierungen: planktonisch aerob, Biofilm, planktonisch anaerob, wobei sich die Wirksamkeit auf planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* bei Nitratzugabe wieder etwas verbessert. Diese Wirkungsverschlechterung kann auf das schlechtere Wachstum von *P. aeruginosa* zurückge-

führt werden, die im Biofilm weniger stark als planktonisch aerob kultivierte Bakterien wachsen, während planktonisch anaerob kultivierter *P. aeruginosa* fast gar nicht wächst. Aber auch andere Resistenzmechanismen könnten eine Rolle spielen.

3.3.2 Wirkung von Meropenem auf *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*

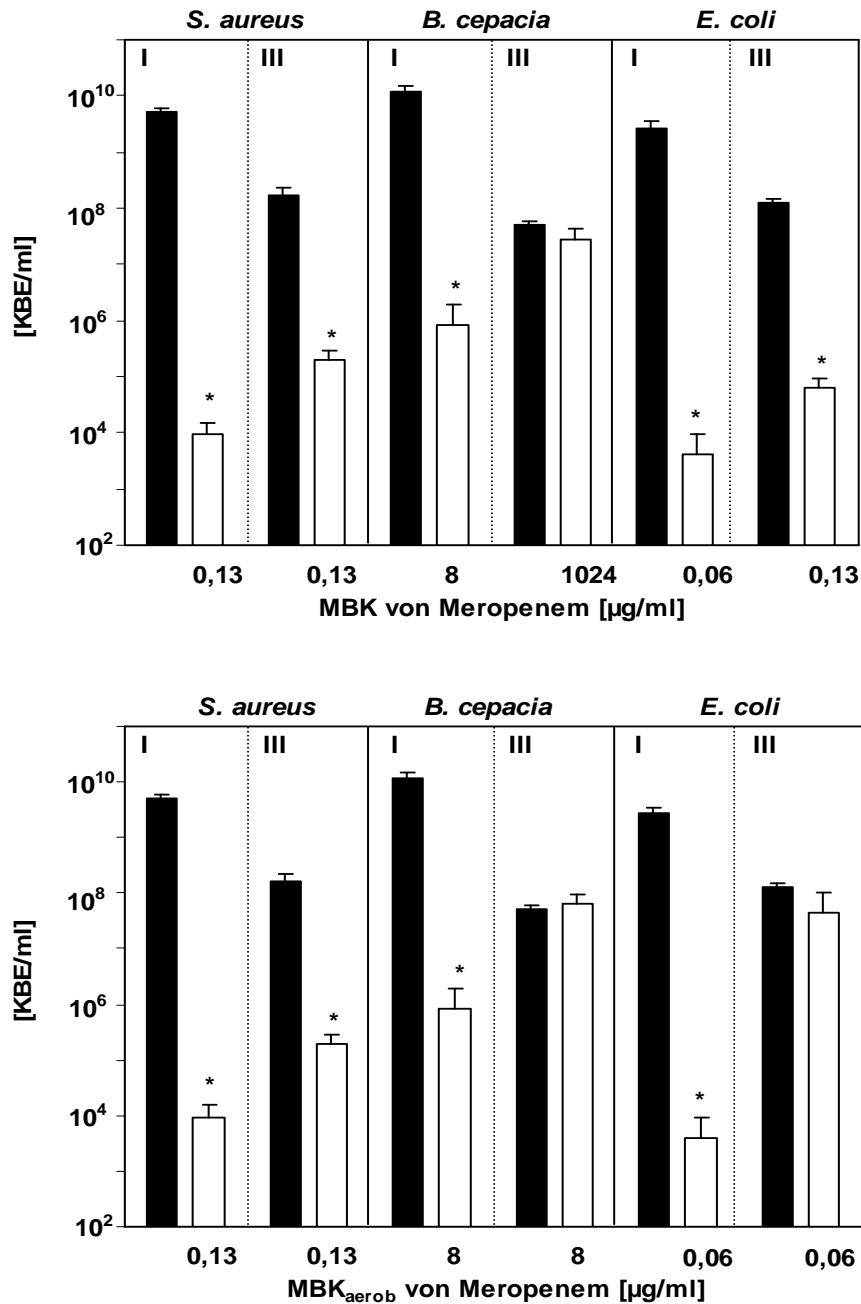


Abb.14 a, b: Wirkung von Merop. auf *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*.

Auf planktonisch aerob kultivierte *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli* hatte Meropenem ebenfalls eine gute Wirkung: *S. aureus* wurde bei einer MBK von 0,13 µg/ml um mehr als 5 Zehnerpotenzen reduziert, *B. cepacia* bei einer MBK von 8 µg/ml um ca. 4 Zehnerpotenzen und *E. coli* bei einer MBK von 0,06 µg/ml um knapp 6 Zehnerpotenzen (Abb. 14 a, I). Meropenem hatte auf planktonisch anaerob kultivierten *B. cepacia* keine signifikante Wirkung (Abb. 14 a, III). Auf planktonisch anaerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* hatte Meropenem immer noch eine gute Wirkung: *S. aureus* wurde bei einer MBK von 0,13 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen reduziert, *E. coli* bei einer MBK von 0,13 um 3-4 Zehnerpotenzen (Abb. 14 a, III). Im direkten Vergleich erkennt man trotzdem, daß sich die Wirkung unter anaeroben Bedingungen generell verschlechtert. Obwohl bei planktonisch anaerob kultiviertem *S. aureus* die anaerobe MBK gleich der aeroben MBK ist, ist zu erkennen, daß eine geringere Keimzahlreduktion erfolgt als bei planktonisch aerob kultivierten Bakterien (Abb. 14 b). Planktonisch anaerob kultivierter *E. coli* wurde bei der aeroben MBK von 0,06 µg/ml nicht signifikant reduziert (Abb. 14 b, III).

Während die Wirkung von Meropenem auf planktonisch aerob kultivierte *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli* insgesamt gut ist, ist zu erkennen, daß sich keine signifikante Wirkung auf planktonisch anaerob kultivierte *B. cepacia* zeigt, möglicherweise aufgrund des ausbleibenden Wachstums der Bakterien. Dagegen ist die Wirkung auf planktonisch anaerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* gegenüber aeroben Bedingungen immer noch gut, wenngleich die Keimzahlreduktionen geringer ausfallen. Hier muß die geringe Minderung der Wirksamkeit in anderen Gründen als dem Wachstum gesucht werden.

3.3.3 Wirkung von Ciprofloxacin auf *P. aeruginosa*

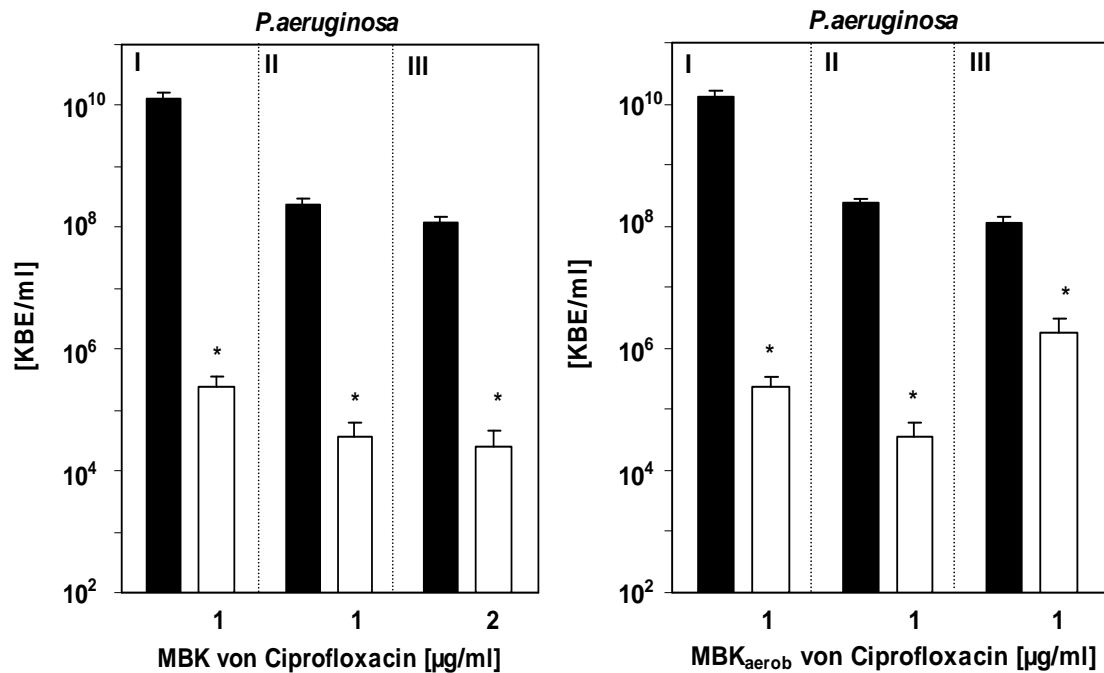


Abb. 15 a, b: Wirkung von Ciprofloxacin auf *P. aeruginosa*.

Ciprofloxacin wirkte auf planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa* gut, er wurde bei einer MBK von 1 µg/ml um knapp 5 Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 15 a, I). Die Wirkung von Ciprofloxacin verschlechterte sich gegen *P. aeruginosa* im Biofilm und planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* nicht wesentlich. Im Biofilm ergab sich bei einer MBK von 1 µg/ml eine Reduktion um knapp 4 Zehnerpotenzen (Abb. 15 a, II). Planktonisch anaerob kultivierter *P. aeruginosa* wurde bei einer MBK von 2 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 15 a, III), bei der aeroben MBK von 1 µg/ml ergab sich nur eine Reduktion um knapp 2 Zehnerpotenzen (Abb. 15 b, III). Im direkten Vergleich erkennt man jedoch auch hier eine schrittweise Verschlechterung der Wirkung in der Reihenfolge der Umweltbedingungen wie bei Meropenem, wenn auch nicht so ausgeprägt.

Insgesamt wirkt Ciprofloxacin gut, doch zeigt sich auch hier, an den Keimzahlreduktionen erkennbar, eine schrittweise Verschlechterung in der Reihenfolge der Kultivierungen planktonisch aerob, Biofilm, plankto-

nisch anaerob, wenngleich nicht so ausgeprägt wie bei Meropenem. Ciprofloxacin wirkt also auch auf schlecht wachsende Bakterien. Da eine Verschlechterung der Wirkung dennoch vorhanden ist, wird deutlich, daß auch noch andere Mechanismen als verlangsamtes Wachstum für die Wirkungsverminderung unter Biofilmwachstum und planktonisch anaerob Kultivierung verantwortlich zu machen sind.

3.3.4 Wirkung von Ciprofloxacin auf *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*

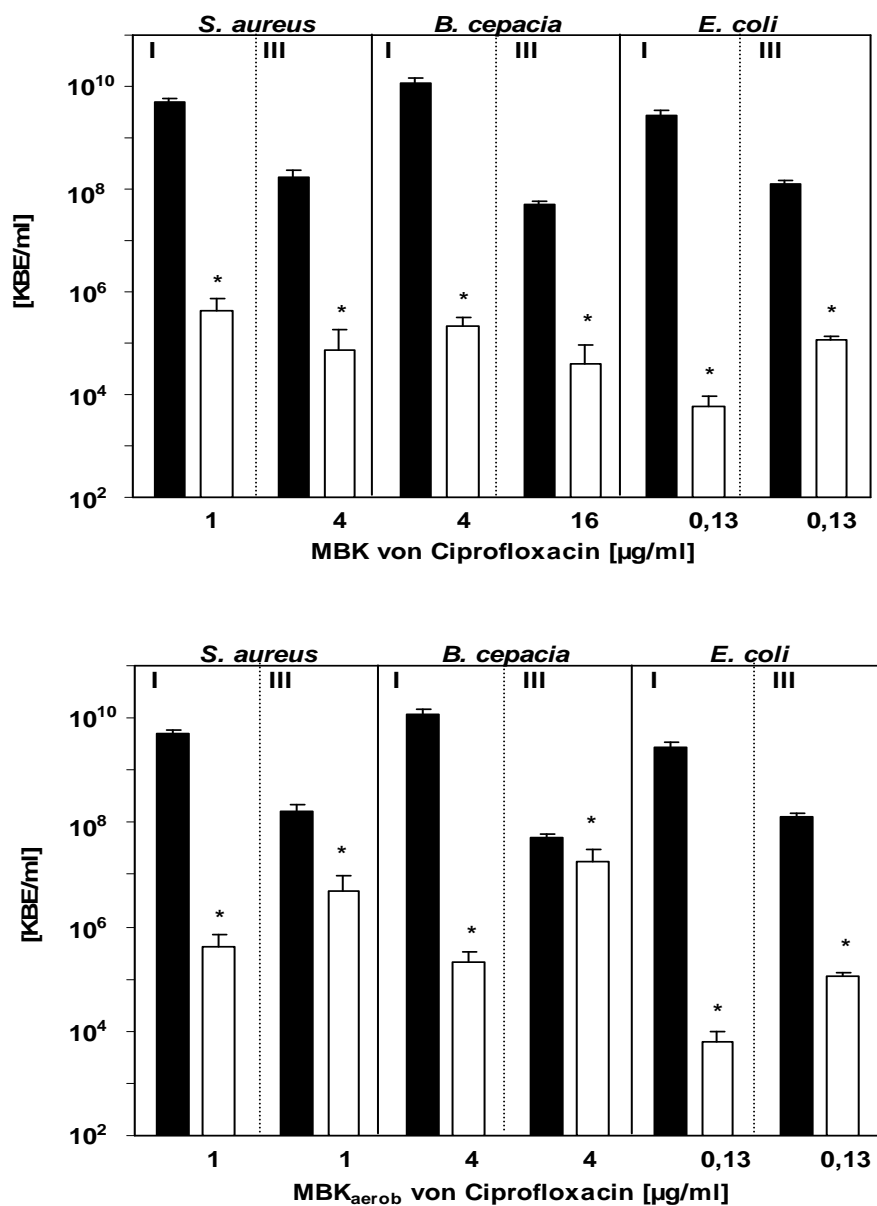


Abb. 16 a, b: Wirkung von Ciprofl. auf *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*.

Ciprofloxacin wirkte auf planktonisch aerob kultivierte *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli* gut: *S. aureus* wurde bei einer MBK von 1 µg/ml um ca. 4 Zehnerpotenzen reduziert, *B. cepacia* bei einer MBK von 4 µg/ml um ca. 5 Zehnerpotenzen, *E. coli* bei einer MBK von 0,13 µg/ml um 5-6 Zehnerpotenzen (Abb.16 a, I). Ebenfalls relativ gut wirkte Ciprofloxacin auf planktonisch anaerob kultivierte Bakterien, wenngleich sich die Wirkung insgesamt um ca. 2 Konzentrationsstufen verschlechterte: *B. cepacia* wurde bei einer MBK von 16 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen reduziert, *S. aureus* bei einer MBK von 4 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen und *E. coli* bei einer MBK von 0,13 um ca. 3 Zehnerpotenzen (Abb. 16 a, II). Im direkten Vergleich erkennt man bei allen Bakterien die Verschlechterung der Wirkung unter anaerobem Wachstum, anaerob kultivierter *S. aureus* wurde bei der aeroben MBK von 1 µg/ml um knapp 2 Zehnerpotenzen signifikant reduziert, *B. cepacia* bei der aeroben MBK von 4 µg/ml um weniger als 1 Zehnerpotenz, bei *E. coli* war die anaerobe MBK gleich der aeroben MBK, wobei die Reduktion wesentlich geringer ist als unter aeroben Bedingungen (Abb. 16 b, III).

Unter aeroben Bedingungen hat Ciprofloxacin bei allen Bakterien eine gute Wirkung, und auch unter anaeroben Verhältnissen bleibt die Wirkung bei allen Bakterien relativ gut. Die Keimzahlreduktionen fallen unter anaerobem Wachstum jedoch insgesamt geringer aus. Der Grund ist hier ebenfalls nicht nur im verringertem Wachstum, sondern auch in anderen Mechanismen zu suchen.

3.3.5 Ceftazidim gegen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*

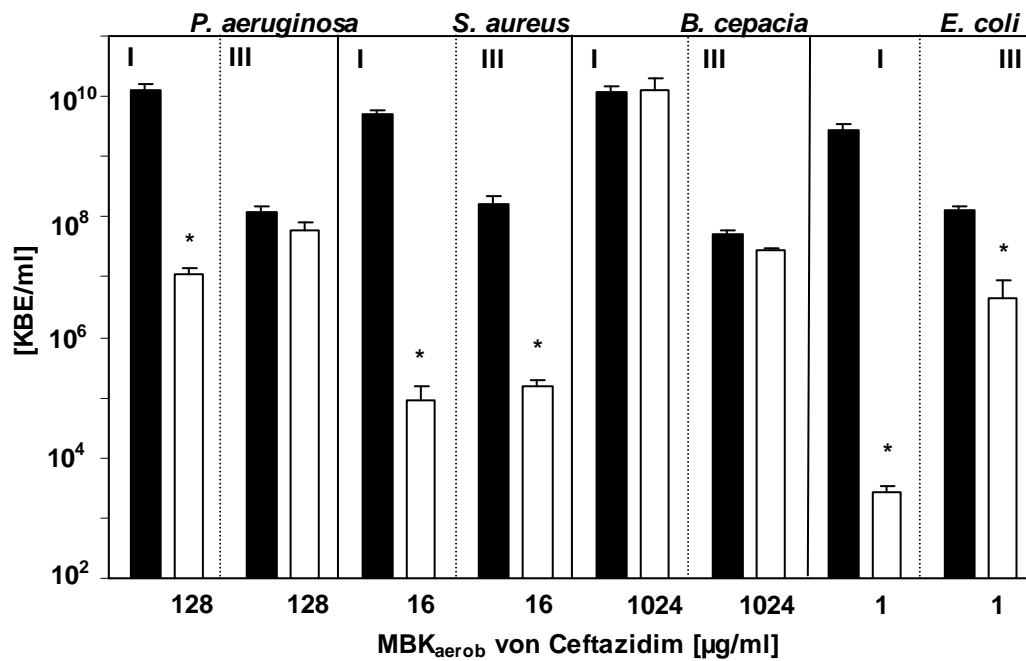
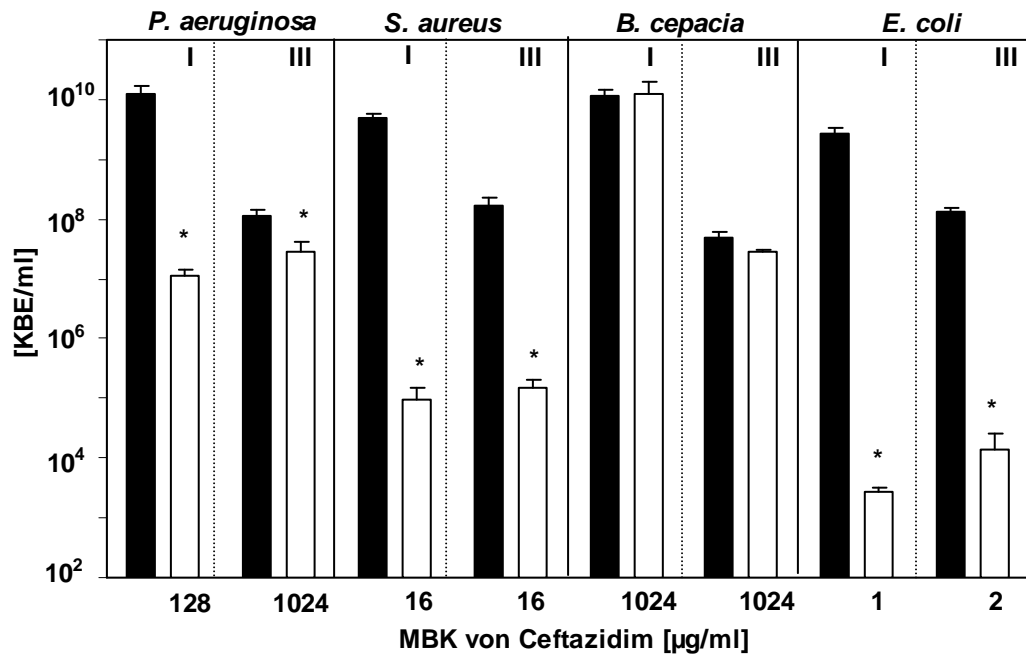


Abb. 17 a, b: Wirkung von Ceftazidim.

Ceftazidim wirkte auf planktonisch aerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* gut: *S. aureus* wurde bei einer MBK von 16 µg/ml um 4-5 Zehnerpotenzen reduziert, *E. coli* bei einer MBK von 1 µg/ml um 6 Zehnerpotenzen (Abb. 18 a, I). Gegen planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa* wirkte es schlecht, eine Reduktion um ca. 3 Zehnerpotenzen wurde erst bei einer MBK von 128 µg/ml erreicht (Abb. 18 a, I). Auf planktonisch aerob kultivierten *B. cepacia* zeigte sich keine Wirkung, die Bakterien wuchsen bei einer Konzentration von 1024 µg/ml genauso gut wie die Kontrolle (Abb. 18 a, I). Auf planktonisch anaerob kultivierte *P. aeruginosa* und *B. cepacia* hatte Ceftazidim keine signifikante Wirkung (Abb. 18 a, III). Gegen planktonisch anaerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* war die Wirkung etwa gleich gut wie unter aeroben Bedingungen, aber auch hier fielen die Keimzahlreduktionen geringer aus: *S. aureus* wurde bei einer MBK von 16 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen, *E. coli* bei einer MBK von 2 µg/ml um knapp 4 Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 18 a, III). Im direkten Vergleich zeigte sich, daß bei planktonisch anaerob kultiviertem *P. aeruginosa* bei der aeroben MBK von 128 µg/ml überhaupt keine signifikante Reduktion mehr erfolgte, *E. coli* wurde bei der aeroben MBK von 1 µg/ml lediglich um 1-2 Zehnerpotenzen signifikant reduziert, bei *S. aureus* und *B. cepacia* war die anaerobe MBK gleich der aeroben MBK bzw. der maximal getesteten Konzentration (Abb. 18 b, III).

Auf aerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* wirkt Ceftazidim relativ gut, während die Wirkung auf aerob kultivierten *P. aeruginosa* schlecht ist und aerob kultivierter *B. cepacia* sich unempfindlich zeigt. Auf anaerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* wirkt Ceftazidim immer noch gut, wenngleich die Keimzahlreduktionen geringer ausfallen, wobei sich auf anaerob kultivierten *P. aeruginosa* keine Wirkung mehr zeigt. Bei planktonisch anaerob kultiviertem *S. aureus* und *E. coli* lassen die geringeren Keimzahlreduktionen auf Mechanismen der Wirkungsverschlechterung schließen, die nicht verringertes Wachstum betreffen. Bei planktonisch anaerob kultiviertem *P. aeruginosa* kann man eine Verminderung des Wachstums für die Verschlechterung der Wirkung verantwortlich machen, *B. cepacia* zeigt sich generell resistent.

3.3.6 Tobramycin gegen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli*

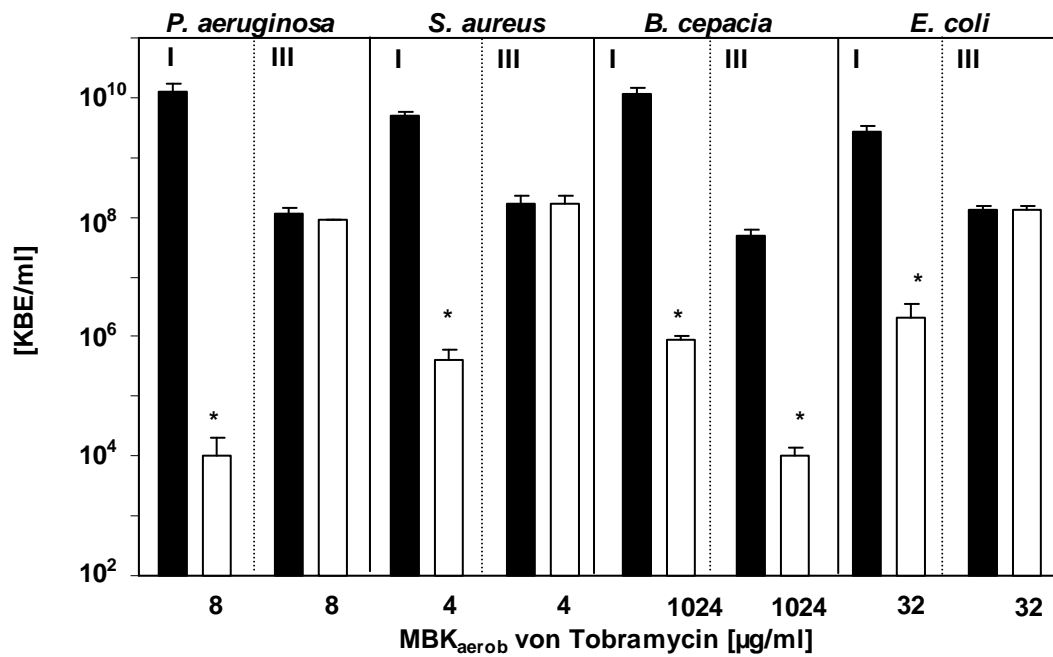
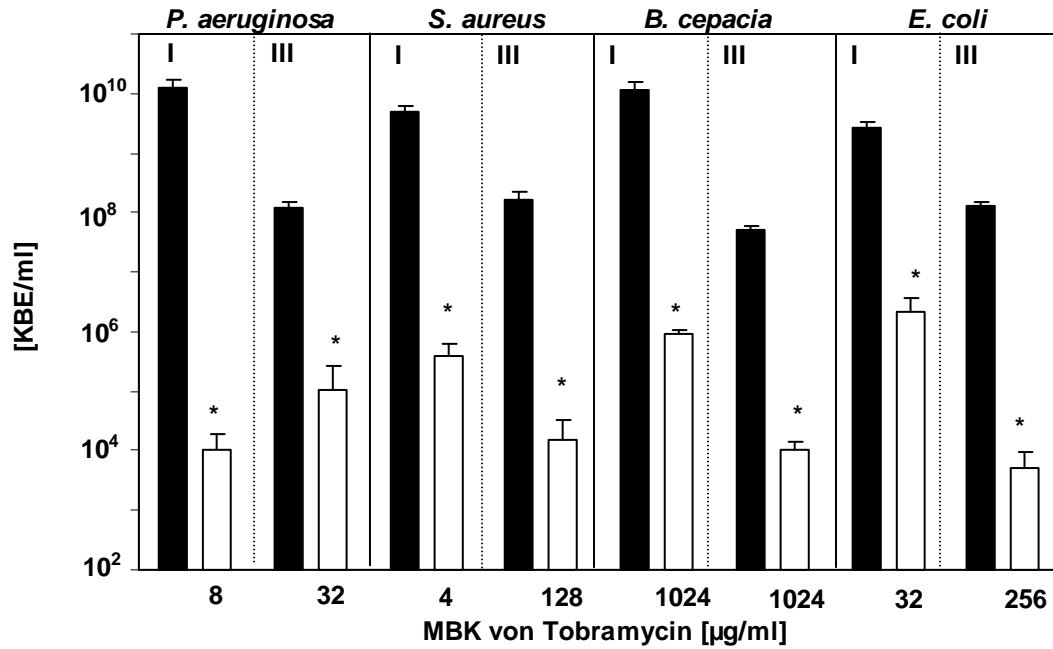


Abb. 18 a, b: Wirkung von Tobramycin.

Gegen Tobramycin war planktonisch aerob kultivierter *B. cepacia* resistent, die MBK war erst bei 1024 µg/ml erreicht (Abb. 20 a, I). Gegen die übrigen Bakterien wirkte Tobramycin relativ gut: *P. aeruginosa* wurde bei einer MBK von 8 µg/ml um ca. 6 Zehnerpotenzen reduziert, *S. aureus* bei einer MBK von 4 µg/ml um ca. 4 Zehnerpotenzen und *E. coli* bei einer MBK von 32 µg/ml um ca. 3 Zehnerpotenzen (Abb. 20 a, I). Auf planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* wirkte Tobramycin um zwei Konzentrationsstufen schlechter, bei einer MBK von 32 µg/ml ergab sich eine Reduktion um ca. 3 Zehnerpotenzen (Abb. 20 a, III). Bei *S. aureus* und *E. coli* verschlechterte sich die Wirkung von Tobramycin noch stärker, *S. aureus* wurde bei einer MBK von 128 µg/ml um ca. 4 Zehnerpotenzen, *E. coli* bei einer MBK von 256 µg/ml um ebenfalls ca. 4 Zehnerpotenzen reduziert (Abb. 20 a, III). Im direkten Vergleich erkennt man, daß Tobramycin unter anaeroben Bedingungen insgesamt deutlich schlechter wirkt: bei planktonisch anaerob kultiviertem *P. aeruginosa* zeigte sich bei der aeroben MBK von 8 µg/ml keine signifikante Reduktion, ebenso bei *S. aureus* bei der aeroben MBK von 4 µg/ml und bei *E. coli* bei der aeroben MBK von 32 µg/ml (Abb. 20 b, III).

Auf aerob kultivierte Bakterien zeigt Tobramycin eine relativ gute Wirkung, ausgenommen *B. cepacia*, der sich als resistent erweist. Unter anaeroben Bedingungen zeigt sich eine deutlich schlechtere Wirkung, bei *S. aureus* stärker ausgeprägt als bei den gramnegativen Keimen *P. aeruginosa* und *E. coli*. Da Tobramycin auch auf nichtwachsende Bakterien wirkt, müssen andere Mechanismen für die deutliche Wirkungsver schlechterung verantwortlich sein als vermindertes Bakterienwachstum.

3.3.7 Zusammenfassung

Während die Antibiotika planktonisch aerob kultivierte Bakterien in der Regel bei niedrigen Konzentrationen signifikant reduzieren, müssen bei planktonisch anaerob kultivierten Bakterien die Konzentrationen der Antibiotika oft deutlich erhöht werden, sofern damit überhaupt vergleichbare Wirkungen erzielt werden können. Die Wirkung von Meropenem gegen *P. aeruginosa* verschlechtert sich im Biofilm deutlich, gegen planktonisch anaerob kultivierte Bakterien zeigt sich keine Wirkung mehr. Ciprofloxacin wirkt noch am besten, da sowohl gegen planktonisch anaerob als auch im Biofilm kultivierte *P. aeruginosa* noch eine befriedigende Wirkung erzielt werden kann. Bei Meropenem und Ciprofloxacin zeigt sich jedoch eine schrittweise Verschlechterung der Wirkung in Reihenfolge der Kultivierungen: planktonisch aerob, Biofilm, planktonisch anaerob.

3.4 Einfluß von Azithromycin und DNase auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*

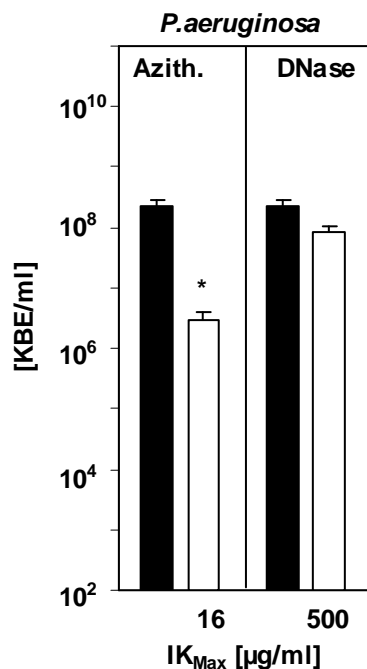


Abb. 19: Wirkung von Azithromycin und DNase auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. **Weißer Balken:** maximale inhibitorische Konzentration ohne toxische Effekte (IK_{Max}), sonst s. Legende zu Abb. 13.

Azithromycin und DNase wurden hier bereits zu der *P. aeruginosa*-Suspension gegeben, die an den Zapfen Biofilm bildete. Ziel war, die Biofilmbildung zu inhibieren, wobei die Bakterien in der Suspension nicht abgetötet werden durften. Die Inhibition wurde quantitativ als Verringerung der Bakterienzahl definiert, indem die Bakterienzahl des mit Inhibitoren behandelten Biofilms mit der Bakterienzahl von unbehandeltem Biofilm verglichen wurde. Ab einer Konzentration von 32 µg/ml wirkte Azithromycin toxisch auf *P. aeruginosa* in der Suspension. Bei der maximalen subinhibitorischen Konzentration von 16 µg/ml erreichte Azithromycin eine quantitative Verringerung der Biofilmbakterien um zwei Zehnerpotenzen. DNase zeigte selbst bei einer Konzentration von 500 µg/l (entspricht 950 U/mg), dem 10-fachen der empfohlenen Herstellerdosis, keinen signifikant quantitativen Effekt auf die Biofilmbakterien, bei der Auszählung ergab sich fast die gleiche Anzahl von Biofilmbakterien wie in der Kontrolle.

Während Azithromycin eine signifikante Verminderung des Biofilmwachstums erzielt, ist dies bei DNase nicht der Fall.

4 Diskussion

4.1 Erläuterungen zu den Methoden

Tests mit Antibiotika gegen die hier untersuchten Erreger werden normalerweise mit planktonisch aerob kultivierten Bakterien durchgeführt [53]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, daß Bakterien unter anaerobem Wachstum oder im Biofilm wesentlich resistenter sein können. Aus diesem Grund ist zu überlegen, Wirkstoffe gegen Lungeninfektionserreger bei CF auch unter diesen Bedingungen zu testen. Dies gilt zum einen für neu zu erprobende Wirkstoffe, ist zum anderen aber auch bei klinischen Tests gegen herkömmliche Antibiotika zu erwägen, um diese gezielter einsetzen zu können. Ob dies durchführbar und von therapeutischem Nutzen ist, muß die Praxis zeigen. Der in dieser Arbeit etablierte Biofilmassay wäre aufgrund seiner schnellen und einfachen Handhabung für solche Tests geeignet. Die Ergebnisse aus den Antibiotikatests mit planktonisch anaerob kultivierten Bakterien und den Biofilmassays wurden in dieser Arbeit so ermittelt, daß sie untereinander direkt verglichen werden konnten um zu feststellen zu können, ob der Faktor anaerobes Wachstum Einfluß auf die Wirkung von Antibiotika gegen Biofilm bildende Bakterien hat. Um die Ergebnisse der Tests vergleichen zu können, wurde darauf geachtet, die experimentellen und statistischen Parameter einheitlich zu gestalten.

4.2 Wirkungen der Antibiotika

4.2.1 Meropenem

Meropenem wirkt wie alle β -Lactam-Antibiotika indem es die Zellwandsynthese der Bakterien hemmt. Der β -Lactamring der β -Lactam-Antibiotika hemmt Transpeptidasen, welche die Quervernetzung der bakteriellen Mureinwand katalysieren, diese werden deshalb auch Penicillin bindende Proteine (PBP) genannt. Dies führt zur Instabilität der Zellwand und schließlich zur Zerstörung des Bakteriums durch Lyse [53]. Im Gegensatz zu anderen Antibiotika hat Meropenem aufgrund seiner chemischen Struktur ein sehr breites Wirkungsspektrum, das grampositive wie gramnegative Bakterien als auch Anaerobier mit ein-

schließt [21]. Der wichtigste konventionelle Resistenzmechanismus von *P. aeruginosa* gegen Meropenem besteht in einer verminderten Permeabilität der äußeren Membran des Bakteriums [42]. Bei *S. aureus* sind zwei Resistenzmechanismen möglich, die Produktion von β -Lactamasen, die das Antibiotikum inaktivieren sowie Veränderungen der PBP [57]. Bei den noch wenig erforschten *B. cepacia* wurde bei resistenten Keimen eine vermehrte Produktion von β -Lactamasen entdeckt [42]. Bei resistenten *E. coli* ist eine Kombination aus einer verminderten Permeabilität der äußeren Membran und β -Lactamasen vorhanden [67].

Während Meropenem die Keimzahlen von planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* und *E. coli* signifikant reduziert, was seinem breiten Wirkspektrum entspricht, zeigt sich bei planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* und *B. cepacia* keine signifikante Wirkung. Davey et. al. beschreiben bei *P. aeruginosa* und dem mit Meropenem verwandten Carbapenem Imipenem ebenfalls, daß sich unter anaeroben Bedingungen selbst bei hohen Konzentrationen keine signifikante Reduktion zeigt [24]. Dies könnte damit erklärt werden, daß diese Bakterien, wie aus den Wachstumskurven hervorgeht, unter anaeroben Bedingungen kaum oder nur sehr langsam wachsen, da Meropenem als β -Lactam-Antibiotikum nur auf wachsende Bakterien tödlich wirkt, indem es die Zellwandsynthese inhibiert. Dem langsamen Wachstum der Bakterien entspricht ein niedriger Gehalt von Nitrat, welches die Grundlage für den wichtigsten alternativen Stoffwechselweg zur Zellatmung unter anaeroben Bedingungen ist (s. S. 4), wobei der Gehalt an Nitrat im verwendeten Nährmedium vergleichbar mit dem in der Schleimschicht der unteren Atemwege der CF-Lunge ist (ca. 20 μ M, gemessen in [96]). Unter hoher Nitratzugabe zum Medium verbessert sich die Wirkung von Meropenem entsprechend deutlich. Dennoch ist auch unter diesen Bedingungen die MBK deutlich höher als bei planktonisch aerob kultivierten Bakterien, und die Tatsache, daß die Bakterien auch anaerob unter Nitratzugabe nicht so effektiv abgetötet werden wie unter aeroben Bedingungen, läßt auf zusätzliche Mechanismen schließen, die für die schlechtere Wirksamkeit unter anaerobem Wachstum verantwortlich sind. Wie bereits er-

wähnt ist der wichtigste intrinsische Resistenzmechanismus von *P. aeruginosa* gegen Meropenem die Impermeabilität der äußeren Membran. Dazu passend ist bekannt, daß *P. aeruginosa* das elektrische Transmembranpotential seiner äußeren Membran unter anaeroben Bedingungen verändert, was eine verminderte Transportrate von Antibiotika durch die äußere Membran zur Folge haben kann [43]. Gegen planktonisch anaerob kultivierte *S. aureus* und *E. coli* hingegen wirkt Meropenem ähnlich wie unter aeroben Bedingungen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß diese Bakterien unter anaeroben Bedingungen ein besseres initiales Wachstum als *P. aeruginosa* und *B. cepacia* haben, da sie als fermentierende Bakterien unter anaeroben Bedingungen die Glycolyse nutzen können [73]. Allerdings fallen auch hier die Keimzahlreduktionen geringer aus als unter aeroben Bedingungen. Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, daß die Bakterien metabolisch nicht so aktiv sind wie unter Aerobiosis und sich langsamer teilen.

Im Biofilm war die MBK von Meropenem gegen *P. aeruginosa* um drei Konzentrationsstufen höher als im Vergleich zu planktonisch aerob kultivierten Bakterien. Bei Aaron et. al. waren die MBKs bei mehreren Patientenisolaten von *P. aeruginosa* um 2-4 Konzentrationsstufen erhöht [1], was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Ceri et. al. haben versucht, die Konzentration zu ermitteln, bei der die Bakterien im Biofilm eradiziert wurden. Bei dem mit Meropenem verwandten Carbapenem Imipenem war keine Eradikation zu erreichen [12]. Somit weißt *P. aeruginosa* im Biofilm eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Meropenem auf als planktonisch aerob kultivierte Zellen. Zudem persistierten die Bakterienzahlen auch bei hohen Antibiotikakonzentrationen auf erhöhtem Niveau im Vergleich zu planktonisch aerob kultivierten Bakterien.

Mechanismen, die speziell bei Meropenem zur erhöhten Resistenz von *P. aeruginosa*-Biofilmen beitragen sind noch nicht ausreichend erforscht. Folglich können hier nur Hypothesen diskutiert werden, die in Zukunft näherer experimenteller Prüfung bedürften. Einen Hinweis gibt die Wirkung von Meropenem auf *P. aeruginosa* in dieser Arbeit. Vergleicht man dessen Wirkung unter den

drei angewendeten Kultivierungen: planktonisch aerob, Biofilm und planktonisch anaerob; so fällt auf, daß sich die Wirkung in dieser Reihenfolge kontinuierlich verschlechtert (s. S. 29, Abb.13). Möglicherweise sind dafür zunehmend anaerobe Wachstumsbedingungen verantwortlich. Für die Bakterien im Biofilm würde das bedeuten, daß die aufgrund eines größeren Sauerstoffangebots metabolisch aktiveren Zellen an der Oberfläche des Biofilms abgetötet werden, während die tiefer in die Matrix eingebetteten Zellen mit geringerem Sauerstoffangebot inaktiver sind, langsamer wachsen und am Leben bleiben, da auf diese das Antibiotikum weniger gut wirken kann. Sowohl bei planktonisch anaerob als auch in Biofilm kultivierten Bakterien wurde gezeigt, daß sich die Wirksamkeit von Antibiotika deutlich verringert, je langsamer die Bakterien wachsen [28; 35; 80]. Zudem wurde nachgewiesen, daß Biofilmbakterien, die sich in tieferen Schichten des Biofilms befinden, nach einer Antibiotikabehandlung noch am Leben sind, während Bakterien, die sich nahe an der Oberfläche befinden, durch die Antibiotika abgetötet werden [1; 90]. Mit Hilfe eines fluoreszierenden metabolischen Markers wurde gezeigt, daß eine rege metabolische Aktivität nur unmittelbar an der Oberfläche des Biofilms auftritt und in der Tiefe rapide abnimmt [47]. Walters et. al haben die Wirtktiefe von Antibiotika mit Hilfe eines Elektronenmikroskops bestimmt. Es zeigte sich, daß die Wirtktiefe der Antibiotika 30-80 µm von der Oberfläche aus betrug, auch bei vollständiger Penetration der Antibiotika. Eine Messung des Sauerstoffgehalts ergab, daß Sauerstoff bis zu 40-90 µm tief im Biofilm noch meßbar ist [90]. Dies erhärtet die These, daß anaerobe Bedingungen und ein daraus resultierender reduzierter Metabolismus die Wirkung von Antibiotika deutlich vermindert. Jedoch muß darauf hingewiesen werden, daß mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nur relative dünne Biofilme erzeugt werden können. Aaron et. al., die eine ähnliche Methode zur Erzeugung von Biofilm benutzt haben, haben gezeigt, daß sich lediglich ein maximal 50 µm dicker Biofilm erzeugen läßt [1]. Die von Walters et. al mit einem Fließsystem erzeugten Biofilme waren dagegen sehr dick (ca. 230 µm), somit herrschen in den hier erzeugten Biofilmen allenfalls mikroaerophile Bedingungen vor. Inwiefern anaerobe Bedingungen als Resistenzfaktor bei diesen Biofilmen Relevanz haben, sollte näher geprüft werden. Dennoch wurde in die-

ser und in anderen Arbeiten gezeigt [1, 14; 22], daß Antibiotika auch in dünnen Biofilmen weniger wirksam sind. Dafür können auch andere Faktoren verantwortlich sein.

So gehen Spoering et. al. davon aus, daß im Biofilm eine im Vergleich zu planktonischen Kulturen vermehrte Anzahl von Bakterien eines besonderen Phänotyps existieren, die eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika aufweisen, was allerdings nicht auf mutationsbedingte Resistenzen zurückzuführen ist [80]. Sie vermuten, daß die Anzahl dieser persistierenden Zellen von der Zelldichte abhängt. Da im Biofilm die Zelldichte sehr hoch ist, könnten dort relativ viele dieser Zellen existieren. Ist dies der Fall, hätte man eine schlüssige Erklärung dafür, warum mukoide, Biofilm bildende Pseudomonaden in der Lunge von CF-Patienten nicht zu eradizieren sind. Auch wenn ein Großteil der Bakterien abgetötet würde, wären die restlichen persistierenden Zellen durch die EPS-Matrix vor dem Immunsystem geschützt und könnten die Bakterienpopulation wieder regenerieren. Für die Resistenz der Bakterien gegen Antibiotika würde aber lediglich die Existenz von persistierenden Zellen eine Rolle spielen. Spoering et. al. präsentieren Ergebnisse, in denen planktonisch kultivierte Bakterien in der stationären Phase genauso resistent sind wie Bakterien im Biofilm. Nach ihrer Hypothese würde es ausreichen, für Antibiotikatests planktonische Bakterien in der stationären Phase zu benutzen [80].

Doch auch andere, biofilmspezifische Resistenzmechanismen können existieren. So zeigen mehrere Arbeiten, daß Biofilme von *P. aeruginosa* [18; 35], aber auch die anderer Bakterien [3; 28] resistenter als planktonische Zellen in der stationären Phase sein können. Biofilmbakterien müssen trotzdem nicht immer resistenter sein als planktonische Bakterien, hier sind spezies- und antibiotikaspezifische Unterschiede möglich [32; 33; 35]. Weiterhin wurden Fälle beschrieben, in denen die vom Biofilm abgelösten Bakterien resistenter als planktonische Bakterien waren [7; 28; 35]. Hier könnte die biofilmspezifische Veränderung des Phänotyps eine Rolle spielen. Andererseits wurde in anderen Arbei-

ten beschrieben, daß abgelöste Bakterien schnell wieder sensibel werden [2; 4; 90; 95].

Schließlich können auch konventionelle Resistenzmechanismen im Biofilm eine Rolle spielen, indem sie im Biofilm stärker zum Tragen kommen als bei planktonischen Bakterien. So demonstrieren Tresse et. al. daß ein Porin der äußeren Membran von *E. coli* herunterreguliert wird, wenn diese im Biofilm existieren [87]. Diese Bakterien zeigten eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika, was möglicherweise darauf zurückzuführen sein könnte, daß dieses Porin für Antibiotika nicht mehr zur Diffusion zur Verfügung steht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die Biofilmmexistenz es den Bakterien ermöglicht, sich besser auf Antibiotika einzustellen als planktonische Bakterien. So haben Anderl et. al. [2] beschrieben, daß β -Lactamase positive Biofilme die Penetration von Ampicillin behindern, wodurch tiefer liegende Bakterien vor dem Antibiotikum besser geschützt sind, weil sie das Antibiotikum rechtzeitig inaktivieren können.

4.2.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin ist ein Gyrasehemmer und gehört zur Gruppe der Chinolone. Es wirkt durch Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase (Topoisomerase II). Dieses Enzym besitzt eine wesentliche Funktion bei der Replikation, Transkription und Reparatur der DNA. Wird es gehemmt, geht die physiologische Form des Chromosoms in eine weniger stark verdrillte Form über, wodurch der Raumbedarf des Chromosoms steigt. Exonukleasen zerlegen die chromosomale DNA in kleinere Bruchstücke, als Folge davon stirbt das Bakterium ab [53]. Bei resistenten *P. aeruginosa* existieren zwei Resistenzmechanismen, Mutationen der DNA-Gyrase und Effluxpumpen [42] ebenso bei *S. aureus* [57]. Bei *B. cepacia* mit Chinolonresistenz wurden Mutanten mit einer erhöhten Expression von Effluxpumpen entdeckt [42]. Bei *E. coli* ist der wichtigste Mechanismus ebenfalls die Veränderung der DNA-Gyrase, aber auch Impermeabilität und Effluxpumpen werden beschrieben [77].

Ciprofloxacin reduziert ebenfalls die Keimzahlen aller aerob kultivierten Bakterien signifikant bei niedrigen Konzentrationen. Gegen anaerob kultivierte Bakterien wirkt Ciprofloxacin nur geringfügig schlechter. Bei *P. aeruginosa* war im Vergleich zu planktonisch aerob kultivierten Bakterien die MBK um eine Konzentrationsstufe, bei *S. aureus* und *B. cepacia* um zwei Stufen erhöht, bei *E. coli* blieb sie gleich. Moody et. al. haben mehrere klinische Isolate von *P. aeruginosa* gegen Ciprofloxacin getestet, bei vieren war die anaerobe MBK gleich der aeroben MBK, bei einem war sie um eine Stufe erhöht, bei einem um zwei Stufen [64]. Rubinstein et. al. haben bei einer Testung von klinischen Isolaten, unter denen sich auch *P. aeruginosa* befand, beschrieben, daß die Wirkung von Ciprofloxacin die MBK nicht beeinflußt [76]. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen dieser Arbeit überein. Für verschiedene Stämme von *E. coli* beschreiben Bernhard et. al. keine Veränderung der MBK unter anaeroben Bedingungen [6], Cid et. al. haben gegen klinische Isolate von *E. coli* lediglich die MHK getestet, unter anaeroben Bedingungen jedoch keine Veränderungen feststellen können [13]. Cooper et. al. [17] und Moody et. al. [64] beschreiben für je einen Stamm von *E. coli* ebenfalls keine Veränderung der MBK. Diese Ergebnisse bestätigen alle, daß sich die MBK von Ciprofloxacin bei *E. coli* unter anaeroben Bedingungen nicht wesentlich verändert. Lewin et. al. [55] beschreiben jedoch, daß Ciprofloxacin unter anaeroben Bedingungen seine bakterizide Wirkung verliert, diese Ergebnisse widersprechen jedoch denen dieser Arbeit und denen der anderen zitierten Arbeiten. Die insgesamt gute Wirkung von Ciprofloxacin unter anaeroben Bedingungen auch gegen die schlecht wachsenden *P. aeruginosa* und *B. cepacia* könnte damit erklärt werden, daß Ciprofloxacin nicht nur gegen wachsende Bakterien wirkt, sondern immer dann, wenn die DNA-Gyrase benötigt wird (zur Replikation, Transkription oder Reparaturzwecken). Die allenfalls geringfügig schlechtere Wirkung könnte dadurch erklärt werden, daß die Bakterien unter anaeroben Bedingungen metabolisch weniger aktiv sind und somit die DNA-Gyrase weniger benötigt wird. So zeigen Zeiler und Voigt, daß Ciprofloxacin auch in der stationären Phase wirksam ist [99], wenn auch die Wirksamkeit etwas schlechter ist als gegen wachsende Bakterien, wie auch Brooun et. al. zeigen [7].

In dieser Arbeit war die MBK von Ciprofloxacin gegen *P. aeruginosa* im Biofilm gleich der unter aeroben Verhältnissen. Bei Aaron et. al. waren die MBKs bei mehreren Isolaten von *P. aeruginosa* gleich denen bei planktonisch aerob kultivierten Bakterien oder bis zu 2 Stufen höher [1]. Ceri et. al. behaupten, die Bakterien mit Ciprofloxacin eradiziert zu haben [13], allerdings gilt zu bedenken, daß der dort erzeugte Biofilm sehr dünn war. In dieser Arbeit fällt die Reduktion der Keimzahl im Biofilm geringer aus als gegen planktonisch aerob kultivierte Bakterien, und bei sehr hohen Konzentrationen des Antibiotikums persistieren die Bakterienzahlen auf erhöhtem Level. Walters et. al. [90] haben in ihrer Arbeit ebenfalls gezeigt, daß *P. aeruginosa* im Biofilm, mit der Konzentration Ciprofloxacin behandelt, die der hier ermittelten MBK gegen planktonisch aerob kultivierte Bakterien entsprach (1µg/ml), nicht so effektiv zu reduzieren war wie planktonisch aerob kultivierte Bakterien.

Die bei Meropenem festgestellte Verschlechterung der Wirkung des Antibiotikums in der Reihenfolge der Kultivierungsarten: planktonisch aerob, Biofilm, planktonisch anaerob läßt sich bei Ciprofloxacin nicht so deutlich feststellen, da alle optimalen Konzentrationen im selben Bereich liegen. Dennoch zeigt sich, daß auch hier die Keimzahlreduktionen geringer ausfallen (s. S. 34 Abb. 15 b). Also läßt sich auch hier die Hypothese vertreten, daß eine schrittweise Verstärkung der anaeroben Bedingungen für die Verschlechterung der Wirkung von Ciprofloxacin verantwortlich ist, wenn auch nicht so deutlich wie bei Meropenem. Des weiteren lassen sich die bei Meropenem aufgezeigten Hypothesen auch bei Ciprofloxacin diskutieren. Wenn auch die Wirkung von Ciprofloxacin unter den in dieser Arbeit getesteten Umweltbedingungen gut ist und das Medikament klinische Verläufe positiv beeinflusst [78], ist jedoch auch mit Ciprofloxacin keine Eradikation von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge zu erreichen [31]. Dies hängt mit dem Versagen des Immunsystems zusammen, welches nicht fähig ist, die im Biofilm befindlichen Bakterien abzutöten [30]. Somit ist die chronische Entzündung nicht aufzuhalten. Dies zeigt deutlich, wie wichtig zukünftige Versuche sind, mit Medikamenten Bildung und Persistenz von Biofilmen zu verhindern.

4.2.3 Ceftazidim

Ceftazidim, das zur Gruppe der Cephalosporine gehört, ist wie Meropenem ein β -Lactam-Antibiotikum und besitzt denselben Wirkmechanismus. Der wichtigste Resistenzmechanismus bei *P. aeruginosa* besteht in β -Lactamasen [42], ebenso bei *S. aureus* [57], *B. cepacia* [42] und *E. coli* [67].

Ceftazidim wirkt gegen planktonisch aerob kultivierten *E. coli* in niedriger Konzentration gut, bei *S. aureus* war jedoch eine wesentlich höhere Konzentration für eine ausreichende Wirksamkeit nötig. Der verwendete *P. aeruginosa*-Stamm war resistent, es war kein sensibler Stamm zu finden. Dennoch konnte ein Vergleich zu den anaeroben Ergebnissen gezogen werden. Bei *B. cepacia* war keine Wirkung festzustellen, wobei eine generell hohe Resistenz von *B. cepacia* gegen Ceftazidim bekannt ist [16]. Gegen planktonisch anaerob kultivierten *B. cepacia* zeigte sich dementsprechend ebenfalls keine Wirkung. Obwohl gegen planktonisch aerob kultivierten *P. aeruginosa* noch eine Wirkung festgestellt werden konnte, war dies unter anaeroben Bedingungen nicht mehr der Fall. Wie bei Meropenem könnte dies auf das stark eingeschränkte Wachstum von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen zurückgeführt werden. Gegen planktonisch anaerob kultivierten *S. aureus* blieb die MBK gleich, gegen *E. coli* erhöhte sie sich um eine Stufe. Oie et. al. haben bei verschiedenen Stämmen von *E. coli* die MHKs unter aeroben und anaeroben Bedingungen ermittelt, mit dem Ergebnis, daß anaerobes Wachstum nur einen schwachen Einfluß auf die Wirksamkeit von Ceftazidim hat [68]. Dies entspricht den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen über *E. coli*. Die gute Wirkung von Ceftazidim gegen *S. aureus* und *E. coli* könnte wiederum auf das bessere Wachstum dieser Bakterien unter anaeroben Bedingungen zurückgeführt werden. Allerdings zeigt sich auch hier eine geringere Reduktion der Bakterien im Vergleich zu aeroben Bedingungen. Da Ceftazidim wie Meropenem ein β -Lactam-Antibiotikum ist, sind bei Meropenem erläuterten Hypothesen und Resistenzmechanismen auch hier möglich.

4.2.4 Tobramycin

Tobramycin, ein Aminoglykosid, wirkt, indem es die Proteinbildung von Bakterien durch Bindung an bakterielle Ribosomen stört. Es kommt zur Bildung funktionsuntüchtiger Nonsens-Proteine und dadurch zu irreversiblen Zellschäden, worauf das Bakterium abstirbt [53]. Zwei Arten von Resistenzmechanismen sind für die Resistenz von *P. aeruginosa* verantwortlich. Transferasen können das Antibiotikum inaktivieren und es kann zur Impermeabilität der äußeren oder inneren Membran kommen [42]. *B. cepacia* besitzt als einziges nicht fermentierendes gramnegatives Bakterium nicht das spezielle Aufnahmesystem, das self-promoted uptake (selbst befördernde Aufnahme) genannt wird und für die Aufnahme polykationischer Substanzen, zu denen auch Tobramycin gehört, in die Bakterien benötigt wird. Es ist daher von vornherein gegen Tobramycin resistent [42]. *S. aureus* macht Tobramycin ebenfalls durch Transferasen, welche das Antibiotikum modifizieren, unwirksam, ebenso *E. coli* [62].

Bei Tobramycin war die MBK gegen planktonisch aerob kultivierte *P. aeruginosa* und *S. aureus* schon bei niedrigen Konzentrationen erreicht, bei *E. coli* lag sie höher. Gegen *B. cepacia* war es unwirksam. Bei planktonisch anaerob kultivierten *P. aeruginosa* und *E. coli* erhöhte sich die MBK im Vergleich zu planktonisch aerob kultivierten Bakterien um zwei Konzentrationsstufen, bei *S. aureus* sogar um fünf Stufen. Bryant et. al. beschreiben für das Aminoglykosid Amikacin eine deutliche Erhöhung der MHK gegen verschiedene Isolate von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen [10]. Tack und Sabath beschreiben ebenfalls eine deutliche Erhöhung der MHK bei Stämmen von *E. coli* und auch anderen gramnegativen Bakterien unter anaeroben Bedingungen [85], ebenso Verklin und Mandell [89]. Tack und Sabath beschreiben zusätzlich, daß bei *S. aureus* die MHK unter anaeroben Bedingungen stärker ausfällt als bei gramnegativen Keimen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen dieser Arbeit überein. Nanavaty et. al. [65] beschreiben jedoch bei der Testung von Tobramycin gegen *E. coli*, daß anaerobes Wachstum die MHK nicht beeinflusst.

Tobramycin wirkt als Aminoglykosid zwar auch auf nicht wachsende Bakterien [53], jedoch kann eine Veränderung des Phänotyps bzw. Stoffwechsels auch hier eine verminderte Wirksamkeit unter anaeroben Bedingungen erklären. Wie erwähnt, ist die Aufnahme des Antibiotikums über ein spezielles, energieabhängiges Transportsystem entscheidend für seine Wirksamkeit. Es wurde nachgewiesen, daß in anaerob kultivierten *E. coli* die erhöhte Resistenz mit einem erniedrigten Transmembranpotential der äußeren Membran und daraus folgend einer niedrigen Aktivität dieses Transportsystems korreliert [9]. Dies scheint der Grund zu sein, warum Tobramycin unter anaeroben Bedingungen nicht so effektiv in das Zellinnere von *E. coli* transportiert wird wie unter aeroben Bedingungen [8], weshalb die Wirkung unter anaeroben Bedingungen vermindert ist. Außerdem wurde gezeigt, daß Tobramycin auf langsam wachsende Bakterien schlechter wirkt als auf schnell wachsende [35]. Eine Erklärung dafür wäre, daß in langsam wachsenden Bakterien aufgrund des gedrosselten Metabolismus weniger Proteine synthetisiert werden.

4.3 Inhibition des Biofilmwachstums

Könnte es in Zukunft gelingen, die Bildung von bakteriellen Biofilmen in CF-Lungen wirkungsvoll zu verhindern oder bestehenden Biofilm aufzulösen, so bestünde die Möglichkeit, diese Bakterien zu eradizieren, was ein bedeutender Fortschritt in der Therapie von Lungeninfektionen bei CF wäre. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob das Makrolid Azithromycin die Bildung von Biofilm inhibieren kann. Neben antiinflammatorischen, antioxidativen oder immunmodulatorischen Wirkungen [38] ist auch eine schleimlösende bzw. Biofilm inhibierende Wirkung [66] beschrieben worden. Eine Hypothese, welche die Biofilm inhibierende Wirkung zu erklären versucht, geht davon aus, daß Azithromycin Stoffwechselsysteme in Biofilmen von *P. aeruginosa* blockiert [36; 86]. In dieser Arbeit läßt sich durch Azithromycin eine geringe, jedoch signifikante Reduktion des Biofilmwachstums feststellen. Inwiefern dies klinische Relevanz hat, muß getestet werden. Es ist aber gut möglich, daß Makrolide in einer Kombinationstherapie bei der Inhibition von Biowachstum eine Rolle spielen können. Mit DNase wurde

dasselbe Ziel verfolgt. In einer Arbeit von Whitchurch et. al. [92] wurde die Hypothese aufgestellt, daß extrazelluläre DNA ein wichtiges Substrat für die beginnende Bildung von Biofilm sein könnte. Dort wurde festgestellt, daß DNase die Bildung von Biofilm inhibiert. In dieser Arbeit wurde die Bildung von Biofilm durch die DNase jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dafür könnten unterschiedliche Versuchssysteme bieten.

4.4 Neue Strategien zur Therapie chronischer Lungeninfektionen bei CF

Die Entwicklung und Entdeckung von neuen Medikamenten unter Berücksichtigung von anaeroben Wachstumsbedingungen und Biofilmbildung kann in Zukunft zu gezielten Therapieerfolgen führen. Dabei können Erkenntnisse über Gene, Genprodukte, Metabolismen und Phänotypen der Bakterien Informationen liefern, um geeignete Ziele für eine Therapie auszumachen. Verschiedene Ansätze, die dies zum Ziel haben, sind untersucht worden. So wurde gezeigt, daß Makrolide unter anaeroben Bedingungen besser wirken können als unter aeroben Bedingungen. Dies ist jedoch ein Effekt unter subinhibitorischen Konzentrationen, dessen Mechanismus nicht genau bekannt ist [27]. Ein weiterer Ansatz besteht darin, die Biofilmbildung zu verhindern. Die Inhibition des Biofilmwachstums durch subinhibitorische Makrolidkonzentrationen ist in dieser Arbeit untersucht worden (s. S. 52). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Zufuhr von Substanzen zu behindern, die zum Wachstum des Biofilms benötigt werden. So konnte gezeigt werden, daß Katecholamin-Inotrope das Wachstum von *S. epidermidis*-Biofilmen unterstützen [58]. Könnte verhindert werden, daß diese zu ihrer Funktion gelangen, dann könnte auch die Bildung des Biofilms behindert werden. Yoon et. al. haben anaerobe Biofilme von *P. aeruginosa* untersucht und konnten zeigen, daß die Möglichkeit besteht, die Entwicklung von Biofilm unter anaeroben Bedingungen gezielt zu blockieren [97]. Dies zeigt, daß die Berücksichtigung der Faktoren anaerobes Wachstum und Biofilm helfen können, um gezielt und erfolgreich neue und effiziente Therapien gegen chronische Lungeninfektionen bei CF zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

In den mit Schleim verstopften Luftwegen von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) herrschen anaerobe Verhältnisse vor. Unter diesen Bedingungen kann *Pseudomonas aeruginosa*, der häufigste Erreger von chronischen, zum Tode führenden CF-Lungeninfektionen, verstärkt Biofilme bilden. Es ist bekannt, daß unter anaeroben Verhältnissen Antibiotika sich in ihrer Wirksamkeit verschlechtern können und daß Biofilm die Bakterien vor Antibiotika schützt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß dieser Umweltfaktoren auf die Wirkung der Antibiotika Meropenem und Ciprofloxacin, welche zur Therapie von CF-Lungeninfektionen eingesetzt werden, gegen *P. aeruginosa* untersucht. Außerdem wurde getestet, ob durch die Substanzen Azithromycin und DNase die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* inhibiert werden konnte. Die Antibiotikatests unter anaeroben Bedingungen wurden mit Hilfe einer Anaerobenkammer durchgeführt, dabei wurden noch weitere Bakterien und Antibiotika zu Vergleichszwecken getestet. Um die Wirksamkeit der Antibiotika in Biofilm zu prüfen wurde ein Biofilmtest etabliert. Meropenem reduzierte *P. aeruginosa* unter aeroben Bedingungen gut (minimale bakterizide Konzentration (MBK) = 1 µg/ml), im Biofilm schlechter (MBK = 8 µg/ml) und unter anaeroben Bedingungen zeigte sich keine signifikante Wirkung (MBK > 1024 µg/ml), Ciprofloxacin wirkte insgesamt besser (MBK aerob = 1 µg/ml; MBK im Biofilm = 1µg/ml, MBK anaerob = 2 µg/ml), jedoch war auch hier, wenn die Reduktionen der Keimzahl betrachtet wurden, in der Reihenfolge der Kultivierungsmethoden eine fortschreitende Wirksamkeitsverminderung erkennbar. Während die DNase die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* nicht beeinflusste, konnte mit Azithromycin die Biofilmbildung signifikant inhibiert werden. Die Ergebnisse zeigen, daß es bei Entwicklung und Testung zukünftiger Therapiestrategien gegen CF-Lungeninfektionen sinnvoll ist, die Faktoren anaerobes Wachstum und Biofilm mit einzubeziehen.

6 Anhang

Keimzahlreduktion durch Meropenem (KBE/ml)			
	Kontrolle	MBK	MBK _{aerob}
<i>P. aerug.</i>			
aerob	1,28×10 ¹⁰ ±3,63×10 ⁹	6,33×10 ⁵ ±7,51×10 ⁵ (p=0,004)	-
Biofilm	2,33×10 ⁸ ±5,76×10 ⁶	2,33×10 ⁵ ±5,77×10 ⁴ (p=0,002)	3,33×10 ⁶ ±5,77×10 ⁵ (p=0,002)
anaerob	1,17×10 ⁸ ±2,89×10 ⁷	2,33×10 ⁷ ±1,89×10 ⁷ (p=0,009)	keine Reduktion
anaerob + Nitrat	1,13×10 ⁹ ±3,21×10 ⁸	1,67×10 ⁶ ±2,89×10 ⁵ (p=0,004)	1,33×10 ⁷ ±2,89×10 ⁶ (p=0,004)
<i>S. aureus</i>			
aerob	5,00×10 ⁹ ±1,00×10 ⁹	9,17×10 ³ ±6,29×10 ³ (p=0,001)	-
anaerob	1,67×10 ⁸ ±5,77×10 ⁷	2,00×10 ⁵ ±8,66×10 ⁴ (p=0,008)	s. MBK
<i>B. cepacia</i>			
aerob	1,18×10 ¹⁰ ±3,33×10 ⁹	8,50×10 ⁵ ± 1,01×10 ⁶ (p=0,004)	-
anaerob	5,00×10 ⁷ ±1,00×10 ⁷	2,83×10 ⁷ ±2,89×10 ⁶ (p=0,023)	keine Reduktion
<i>E. coli</i>			
aerob	2,67×10 ⁹ ±7,64×10 ⁸	4,00×10 ³ ± 5,20×10 ³ (p=0,004)	-
anaerob	1,30×10 ⁸ ±2,17×10 ⁷	6,17×10 ⁴ ± 3,33×10 ⁴ (p<0,001)	4,33×10 ⁷ ±5,77×10 ⁷ (p=0,072)

Tab. 1.

Keimzahlreduktion durch Ciprofloxacin (KBE/ml)					
	Kontrolle	MBK		MBK _{aerob}	
<i>P. aerug.</i>					
aerob	1,28×10 ¹⁰ ± 3,62×10 ⁹	2,33×10 ⁵ ± 1,15×10 ⁵ (p=0,004)	-		
Biofilm	2,33×10 ⁸ ± 5,76×10 ⁶	3,67×10 ⁴ ± 2,52×10 ⁴ (p=0,002)	s. MBK		
anaerob	1,17×10 ⁸ ± 2,89×10 ⁷	2,45×10 ⁴ ± 2,22×10 ⁴ (p=0,002)		1,83×10 ⁶ ± 1,32×10 ⁶ (p=0,002)	
<i>S. aureus</i>					
aerob	5,00×10 ⁹ ± 1,00×10 ⁹	4,33×10 ⁵ ± 2,84×10 ⁵ (p=0,001)	-		
anaerob	1,67×10 ⁸ ± 5,77×10 ⁷	7,50×10 ⁴ ± 1,08×10 ⁵ (p=0,008)		4,83×10 ⁶ ± 4,54×10 ⁶ (p=0,008)	
<i>B. cepacia</i>					
aerob	1,18×10 ¹⁰ ± 3,33×10 ⁹	2,17×10 ⁵ ± 1,04×10 ⁵ (p=0,004)	-		
anaerob	5,00×10 ⁷ ± 1,00×10 ⁷	4,07×10 ⁴ ± 5,14×10 ⁴ (p=0,001)		1,73×10 ⁷ ± 1,27×10 ⁷ (p=0,025)	
<i>E. coli</i>					
aerob	2,67×10 ⁹ ± 7,64×10 ⁸	6,00×10 ³ ± 3,61×10 ³ (p=0,026)	-		
anaerob	1,30×10 ⁸ ± 2,17×10 ⁷	1,13×10 ⁵ ± 2,31×10 ⁴ (p<0,001)	s. MBK		

Tab. 2.

Keimzahlreduktion durch Ceftazidim (KBE/ml)						
	Kontrolle	MBK	MBK _{aerob}			
<i>P. aerug.</i>						
aerob	1,28×10 ¹⁰ ±3,62×10 ⁹	1,13×10 ⁷ ±3,21×10 ⁵	-			
		(p=0,004)				
anaerob	1,17×10 ⁸ ±2,89×10 ⁷	2,83×10 ⁷ ±1,44×10 ⁷	5,83×10 ⁷ ±	2,02×10 ⁷		
		(p=0,009)	(p=0,046)			
<i>S. aureus</i>						
aerob	5,00×10 ⁹ ±1,00×10 ⁹	9,33×10 ⁴ ±6,03×10 ⁴	-			
		(p=0,001)				
anaerob	1,67×10 ⁸ ±5,77×10 ⁷	1,50×10 ⁵ ±	5,00×10 ⁴	s. MBK		
		(p=0,008)				
<i>B. cepacia</i>						
aerob	1,18×10 ¹⁰ ±3,33×10 ⁹	keine Reduktion		-		
anaerob	5,00×10 ⁷ ±1,00×10 ⁷	keine Reduktion		s. MBK		
<i>E. coli</i>						
aerob	2,67×10 ⁹ ±7,64×10 ⁸	2,67×10 ³ ±	5,77×10 ²	-		
		(p=0,001)				
anaerob	1,30×10 ⁸ ±2,17×10 ⁷	1,37×10 ⁴ ±	1,21×10 ⁴	4,40×10 ⁶	±4,71×10 ⁶	
		(p<0,001)	(p=0,001)			

Tab. 3.

Keimzahlreduktion durch Tobramycin (KBE/ml)						
	Kontrolle	MBK	MBK _{aerob}			
<i>P. aerug.</i>						
aerob	1,28×10 ¹⁰ ±3,62×10 ⁹	1,05×10 ⁴ ±9,26×10 ³	-			
		(p=0,004)				
anaerob	1,17×10 ⁸ ±2,89×10 ⁷	1,07×10 ⁵ ±1,67×10 ⁵	keine Reduktion			
		(p=0,002)				
<i>S. aureus</i>						
aerob	5,00×10 ⁹ ±1,00×10 ⁹	4,00×10 ⁵ ±2,00×10 ⁵	-			
		(p=0,001)				
anaerob	1,67×10 ⁸ ±5,77×10 ⁷	1,47×10 ⁴ ±1,80×10 ⁴	keine Reduktion			
		(p=0,007)				
<i>B. cepacia</i>						
aerob	1,18×10 ¹⁰ ±3,33×10 ⁹	9,00×10 ⁵ ±	1,73×10 ⁵	-		
		(p=0,004)				
anaerob	5,00×10 ⁷ ±1,00×10 ⁷	1,03×10 ⁴ ±3,51×10 ³	s. MBK			
		(p=0,001),				
<i>E. coli</i>						
aerob	2,67×10 ⁹ ±7,64×10 ⁸	2,13×10 ⁶ ±	1,50×10 ⁶	-		
		(p=0,026)				
anaerob	1,30×10 ⁸ ±2,17×10 ⁷	5,17×10 ³ ±	4,25×10 ³	keine Reduktion		
		(p=0,009)				

Tab. 4.

Biofilminhibition (KBE/ml)		
	Kontrolle	IK _{max}
<i>P. aerug.</i>		
Azithromycin	2,33×10 ⁸ ±5,77×10 ⁷	3,00×10 ⁶ ±1,00×10 ⁶ (p=0,002)
DNase	2,33×10 ⁸ ±5,77×10 ⁷	8,33×10 ⁷ ±2,08×10 ⁷ (p=0,013)

Tab. 5.

Konzentrationswerte aller minimal bakteriziden Konzentrationen (MBK)				
	Meropenem	Ciprofloxacin	Ceftazidim	Tobramycin
<i>P. aeruginosa</i>				
aerob	1	1	128	8
Biofilm	8	1	–	–
Anaerob + Nitrat	32	–	–	–
anaerob	>1024	2	>1024	32
<i>S. aureus</i>				
Aerob	0,13	1	16	4
anaerob	0,13	4	16	128
<i>B. cepacia</i>				
Aerob	8	4	>1024	1024
anaerob	>1024	16	>1024	1024
<i>E. coli</i>				
Aerob	0,06	0(1-50),13	1	32
anaerob	0,13	0,13	2	256

Tab. 6.

7 Literaturverzeichnis

1. Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 40: 4172-9, 2002.
2. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1818-24, 2000.
3. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1251-6, 2003.
4. Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1824-6, 1989.
5. Bayer AS, O'Brien T, Norman DC, Nast CC. Oxygen-dependent differences in exopolysaccharide production and aminoglycoside inhibitory-bactericidal interactions with *Pseudomonas aeruginosa*--implications for endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 23: 21-35, 1989.
6. Bernhardt H, Schulz K, Zimmermann K, Knoke M. Influence of ciprofloxacin and other antimicrobial drugs on different *Escherichia coli* strains in continuous-flow cultures under aerobic and anaerobic conditions. *J Antimicrob Chemother* 42: 147-52, 1998.
7. Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 640-6, 2000.
8. Bryan LE, Kowand SK, Van Den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 15: 7-13, 1979.
9. Bryan LE, Kwan S. Aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in cytochrome d, nitrite reductase, and aerobic transport. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 958-64, 1981.
10. Bryant RE, Fox K, Oh G, Morthland VH. Beta-lactam enhancement of aminoglycoside activity under conditions of reduced pH and oxygen tension that may exist in infected tissues. *J Infect Dis* 165: 676-82, 1992.

11. Cabral DA, Loh BA, Speert DP. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagozytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* 22: 429-31, 1987.
12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37: 1771-6, 1999.
13. Cid D, Piriz S, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Valle J, Garcia S, Vadillo S, de la Fuente R. In vitro activities of enoxacin, enrofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic lambs and kids. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2469-70, 1994.
14. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 88: 22-30, 2000.
15. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774-9, 1992.
16. Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckham DG. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* 2: 321-32, 2003.
17. Cooper MA, Andrews JM, Wise R. Bactericidal activity of sparfloxacin and ciprofloxacin under anaerobic conditions. *J Antimicrob Chemother* 28: 399-405, 1991.
18. Coquet L, Junter GA, Jouenne T. Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and tobramycin. *J Antimicrob Chemother* 42: 755-60, 1998.
19. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-45, 1995.
20. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-22, 1999.
21. Cottagnoud P. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: meropenem. *Cell Mol Life Sci* 59: 1928-33, 2002.
22. Das JR, Bhakoo M, Jones MV, Gilbert P. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J Appl Microbiol* 84: 852-8, 1998.
23. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-67, 2000.

24. Davey P, Barza M, Stuart M. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to killing by ciprofloxacin, gentamicin and imipenem in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 21: 395-404, 1988.
25. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-8, 1998.
26. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1229-56, 1996.
27. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1761-70, 2001.
28. Desai M, Buhler T, Weller PH, Brown MR. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J Antimicrob Chemother* 42: 153-60, 1998.
29. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-93, 2002.
30. Doring G, Bellon G, Knight R. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D, eds. *Cystic Fibrosis*. London: Arnold, p. 109-140, 2000.
31. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16: 749-67, 2000.
32. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother* 30: 803-10, 1992.
33. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother* 30: 791-802, 1992.
34. Equi A, Balfour-Lynn IM, Bush A, Rosenthal M. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 360: 978-84, 2002.
35. Evans DJ, Allison DG, Brown MR, Gilbert P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother* 27: 177-84, 1991.

36. Favre-Bonte S, Kohler T, Van Delden C. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 52: 598-604, 2003.
37. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 23: 330-5, 1997.
38. Gaylor AS, Reilly JC. Therapy with macrolides in patients with cystic fibrosis. *Pharmacotherapy* 22: 227-39, 2002.
39. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-51, 2003.
40. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11: 160-7, 1997.
41. Greenberg EP. Bacterial communication: tiny teamwork. *Nature* 424: 134, 2003.
42. Hancock RE. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clin Infect Dis* 27(Suppl 1): 93-9, 1998.
43. Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, Hilliard GM, Parvatiyar K, Kamani MC, Wozniak DJ, Hwang SH, McDermott TR, Ochsner UA. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1425-43, 2002.
44. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146: 2395-407, 2000.
45. Hoiby N, Frederiksen B. Microbiology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Gedder, D., eds. *Cystic Fibrosis*. London: Arnold, p. 83-107, 2000.
46. Holloway BW, Morgan AF. Genome organization in *Pseudomonas*. *Annu Rev Microbiol* 40: 79-105, 1986.
47. Huang CT, Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl Environ Microbiol* 64: 1526-31, 1998.

48. Huet F, Nivelon JL. Aerosoltherapie et mucoviscidose: enquete nationale. [Aerosol therapy and cystic fibrosis: a national survey]. *Rev Pneumol Clin* 53: 91-7, 1997.
49. Ichimiya T, Takeoka K, Hiramatsu K, Hirai K, Yamasaki T, Nasu M. The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Chemotherapy* 42: 186-91, 1996.
50. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3019-23, 1995.
51. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1075-82, 1995.
52. Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341: 1065-9, 1993.
53. Kurz A. Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Dieterich HA, Eichler H-G, Kurz A, eds. *Antiinfektiva*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, p. 11-130, 1998.
54. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173: 6558-67, 1991.
55. Lewin CS, Morrissey I, Smith JT. The bactericidal activity of sparfloxacin. *J Antimicrob Chemother* 30: 625-32, 1992.
56. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999-1007, 2001.
57. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-73, 2003.
58. Lyte M, Freestone PP, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, Williams PH. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* 361: 130-5, 2003.
59. Mah TF, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-9, 2001.
60. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95: 1005-15, 1998.
61. McFadden E-RJ, Denison DM, Waller JF, Assoufi B, Peacock A, Sopwith T. Direct recordings of the temperatures in the tracheobronchial tree in normal man. *J Clin Invest* 69: 700-5, 1982.

62. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 727-37, 1999.
63. Molin S, Nielsen AT, Christensen BB, Andersen JB, Licht TR, Tolker-Nielsen T, Sternberg C, Hansen MC, Ramos C, Givskov M. Molecular ecology of biofilms. In: Bryers JD, ed. *Biofilms II*. New York: p. 89-120, 2000.
64. Moody JA, Gerding DN, Peterson LR. Evaluation of ciprofloxacin's synergism with other agents by multiple in vitro methods. *Am J Med* 82: 44-54, 1987.
65. Nanavaty J, Mortensen JE, Shryock TR. The effects of environmental conditions on the in vitro activity of selected antimicrobial agents against *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 36: 212-5, 1998.
66. Nguyen T, Louie SG, Beringer PM, Gill MA. Potential role of macrolide antibiotics in the management of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 8: 521-8, 2002.
67. Nordmann P. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1: S100-S106, 1998.
68. Oie S, Kawakami M, Kamiya A, Tomita M. In vitro susceptibility of four serotypes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to antimicrobial agents. *Biol Pharm Bull* 25: 671-3, 2002.
69. Park MK, Myers RA, Marzella L. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14: 720-40, 1992.
70. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8822-8, 2000.
71. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 92 Suppl: 55S-64S, 2002.
72. Poschet JF, Boucher JC, Tatterson L, Skidmore J, Van Dyke RW, Deretic V. Molecular basis for defective glycosylation and *Pseudomonas* pathogenesis in cystic fibrosis lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13972-7, 2001.
73. Proctor RA. Respiration and Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. *Gram-Positive Pathogens*. Washington; D.C.: p. 345-350, 2000.
74. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev K, Borowitz D, Bowman CM, Marshall BC, Marshall S, Smith AL. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients

- with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med* 340: 23-30, 1999.
75. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 361: 681-9, 2003.
 76. Rubinstein E, Mark Z, Samra Y, Alkan M, Berger S. In vitro activity of ciprofloxacin compared with other agents against recent hospital isolates. *Chemioterapia* 5: 75-82, 1986.
 77. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51: 1109-17, 2003.
 78. Scully BE, Nakatomi M, Ores C, Davidson S, Neu HC. Ciprofloxacin therapy in cystic fibrosis. *Am J Med* 82: 196-201, 1987.
 79. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229-36, 1996.
 80. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183: 6746-51, 2001.
 81. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2517-22, 1996.
 82. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292: 107-13, 2002.
 83. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209, 2002.
 84. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9, 2001.
 85. Tack KJ, Sabath LD. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy* 31: 204-10, 1985.
 86. Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1930-3, 2001.
 87. Tresse O, Jouenne T, Junter GA. Underexpression of porin protein OmpF in agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72: 271-4, 1997.

88. Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 151: S47-S53, 1995.
89. Verklin R-MJ, Mandell GL. Alteration of effectiveness of antibiotics by anaerobiosis. *J Lab Clin Med* 89: 65-71, 1977.
90. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 317-23, 2003.
91. Welsh MJ, Ramsey BW. Research on cystic fibrosis: a journey from the Heart House. *Am J Respir Crit Care Med* 157: S148-S154, 1998.
92. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487, 2002.
93. Widdicombe JH. Altered NaCl concentration of airway surface liquid in cystic fibrosis. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1: S8-10, 2001.
94. Wiesemann HG, Steinkamp G, Ratjen F, Bauernfeind A, Przyklenk B, Doring G, der-Hardt H. Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 25: 88-92, 1998.
95. Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F, Critchley I. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 143: 2407-13, 1997.
96. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109: 317-25, 2002.
97. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock RE, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3: 593-603, 2002.
98. Zabinski RA, Walker KJ, Larsson AJ, Moody JA, Kaatz GW, Rotschafer JC. Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 507-12, 1995.
99. Zeiler HJ, Voigt WH. Efficacy of ciprofloxacin in stationary-phase bacteria in vivo. *Am J Med* 82: 87-90, 1987.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Döring für die Überlassung des Themas und die lehrreichen Hinweise zu meiner Arbeit; Herrn Dr. D. Worlitzsch und Frau Dr. M. Ulrich für die Betreuung; Herrn Prof. Dr. W.P. Hammes (emeritiert) und Frau Dr. G. Wolf, Institut für Lebensmitteltechnologie, Abteilung Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart, für die Überlassung von Arbeitsraum sowie Arbeitsmaterial und stets freundlichen Rat und Hilfe.

Lebenslauf

Falk Zanker,
geboren am 24. Februar 1978 in Stuttgart-Bad Cannstatt.
Familienstand: ledig.

Eltern: Dorothee Zanker, geb. Kegel, geboren am 15.07.1950.
Gerhard Zanker, geboren am 03.09.1947.
Geschwister: Steffen Zanker, geboren am 23.06.1974.

Schule
1984-1988 Grundschule in Leutenbach-Nellmersbach.
1984-1997 Max-Born-Gymnasium in Backnang.
1997 Abitur.

Zivildienst
1997-1998 Bei der Arbeiterwohlfahrt in Winnenden.

Studium
1999-2001 Studium der Humanmedizin, Vorklinik, an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.
2001-2006 Studium der Humanmedizin, Klinik, an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Staatsexamina
21.03.2001 Ärztliche Vorprüfung.
11.04.2002 1. Staatsexamen.
08.04.2005 2. Staatsexamen.
23.05.2006 3. Staatsexamen

Promotion
2002-2006 Am Institut für allgemeine Hygiene und Umwelthygiene an der Universität Tübingen, seit April 2004 Teil des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene.