

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Krankenhaushygiene der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer**

**Molekularbiologische Evaluation der Therapiemöglichkeiten von  
Gatifloxacin als Chinolon und Faropenem als Betalaktamantibiotikum**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Alexandra Selaru

**2008**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz

Korreferent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

**Abkürzungen:**Drei- und Einbuchstabencodes für Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptohan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Weitere Abkürzungen

A	Adenosin
BLI	Beta-Laktamase-Inhibitor
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
H. influenzae	Haemophilus influenzae
J	Jahre
kb	Kilobase(n)

MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHK50	Minimale Hemmkonzentration bei der das Wachstum bzw. die Vermehrung von 50% der Stämme gehemmt wird
MHK90	Minimale Hemmkonzentration bei das Wachstum bzw. die Vermehrung von 90% der Stämme gehemmt wird
M. catarrhalis	Moraxella catarrhalis
M. pneumoniae	Mycoplasma pneumoniae
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
QRDR	quinolone resistance determining region
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. pneumoniae	Streptococcus. Pneumoniae
spp.	Species
T	Thymin

**Inhalt:**

<b>1. <u>Einleitung</u></b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Atemwegsinfektionen</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 <i>Erreger von Atemwegsinfektionen</i> .....	12
1.1.1.1 Streptococcus pneumoniae.....	12
1.1.1.2 Moraxella catarrhalis.....	12
<b>1.2 Antibiotika-Therapie und Resistenzentwicklung</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 <i>Chinolone</i> .....	15
1.2.1.1 Stoffeigenschaften und Pharmakodynamik der Chinolone.....	15
1.2.1.2 Resistenzmechanismen gegen Chinolone.....	17
1.2.2 <i>Peneme</i> .....	20
1.2.2.1 Stoffeigenschaften und Pharmakodynamik der Peneme.....	20
1.2.2.2 Resistenzmechanismen gegen $\beta$ -Laktame.....	22
<b>1.3 Epidemiologie</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>24</b>
<b>2. <u>Material und Methoden</u></b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 <i>Chemotherapeutika</i> .....	26
2.1.2 <i>Chemikalien</i> .....	26
2.1.3 <i>Lösungen und Puffer</i> .....	26
2.1.4 <i>Fertig-Kits</i> .....	27
2.1.5 <i>Testblättchen</i> .....	27
2.1.6 <i>Nährmedien</i> .....	27
2.1.7 <i>Primer</i> .....	28
2.1.7.1 Für Streptococcus pneumoniae.....	28
2.1.7.2 Für Moraxella catarrhalis.....	28
2.1.8 <i>Geräte</i> .....	28
2.1.9 <i>Bakterienstämme</i> .....	29
2.1.9.1 Streptococcus pneumoniae.....	29
2.1.9.2 Moraxella catarrhalis.....	30

<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.2.1 <i>Messung der optischen Dichte</i> .....	31
2.2.2 <i>Bestimmung der Lebendkeimzahl</i> .....	31
2.2.3 <i>Methoden zur Identifizierung</i> .....	31
2.2.3.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	31
2.2.3.2 <i>Morxella catarrhalis</i> .....	32
2.2.4 <i>Konservierung, Lagerung und Bebrütung</i> .....	32
2.2.5 <i>Sterilisation</i> .....	32
2.2.6 <i>MHK-Bestimmung</i> .....	32
2.2.6.1 <i>Mikrodilutionsverfahren</i> .....	32
2.2.6.2 <i>Agardilution</i> .....	33
2.2.7 <i>Mutantenselektion</i> .....	34
2.2.8 <i>Agardiffusionstest</i> .....	34
2.2.9 <i>Testung der <math>\beta</math>-Laktamase-Aktivität von <i>M. catarrhalis</i> Isolaten</i> ..	35
2.2.10 <i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	35
2.2.11 <i>Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	36
2.2.11.1 <i>PCR von gyrA, gyrB, parC und parE</i> .....	37
2.2.11.2 <i>PCR von BRO-1 und BRO-2</i> .....	37
2.2.12 <i>Aufreinigung</i> .....	38
2.2.13 <i>Sequenzierreaktion</i> .....	39
2.2.13.1 <i>Temperaturprogramm für die Sequenzierung von gyrA, gyrB, parC und parE</i> .....	39
2.2.13.2 <i>Temperaturprogramm für die Sequenzierung von BRO-1 und BRO-2</i> .....	39
2.2.14 <i>DNA-Fällung</i> .....	40
2.2.15 <i>Sequenzierung</i> .....	40
<b>3. <u>Ergebnisse</u></b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> gegenüber Chinolonen</b> .....	<b>41</b>
3.1.1 <i>Vergleich der Sensibilität klinischer <i>S. pneumoniae</i> Isolate aus Europa gegenüber Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Levofloxacin</i>	41
3.1.2 <i>Resistenzentwicklung bei 20 <i>S. pneumoniae</i> Stämmen gegenüber Gatifloxacin und der Vergleichssubstanz Ciprofloxacin</i> .....	42
3.1.2.1 <i>In-vitro-Aktivität und Resistenzentwicklung</i> .....	42

3.1.2.2 Charkterisierung der selektieren Mutanten von 6 Stämmen <i>S. pneumoniae</i>	45
<b>3.2 Resistenz von <i>S. pneumoniae</i> gegenüber <math>\beta</math>-Laktamen.....</b>	<b>47</b>
<i>3.2.1 Empfindlichkeit klinischer Levofloxacin-resistenter S. pneumoniae Isolate aus Europa gegenüber Faropenem und Penicillin.....</i>	<i>47</i>
<b>3.3 Resistenz von <i>M. catarrhalis</i> gegenüber Chinolonen und <math>\beta</math>-Laktamen</b>	<b>48</b>
<i>3.3.1 Sensibilität klinischer Moraxella catarrhalis Isolate gegenüber Faropenem und der Vergleichssubstanz Penicillin, sowie gegenüber den Chinolonen Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin</i>	<i>48</i>
<b>4. <u>Diskussion</u>.....</b>	<b>50</b>
<b>5. <u>Zusammenfassung</u>.....</b>	<b>59</b>
<b>6. <u>Literatur</u>.....</b>	<b>61</b>
<b>7. <u>Anhang</u>.....</b>	<b>75</b>
<b>8. <u>Danksagung</u>.....</b>	<b>82</b>
<b>9. <u>Lebenslauf</u>.....</b>	<b>83</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Atemwegsinfektionen

Atemwegsinfektionen sind die häufigsten Erkrankungen des Menschen, wobei es zu einem Befall der oberen Atemwege (Nase, Nasennebenhöhlen, Pharynx und Larynx), sowie zu einer Beteiligung der unteren Atemwege (Trachea und Bronchien) kommen kann. Meist handelt es sich um eine virale Infektion, auf deren Boden sich eine bakterielle Sekundärinfektion entwickelt, die häufig antibiotisch behandelt werden muss.

In westlichen Industrieländern ist die Pneumonie die am häufigsten zum Tode führende Infektion und steht in der Todesursachenstatistik an 5. Stelle.

Die Mehrzahl der ambulant erworbenen Pneumonien wird bei Gesunden durch *Streptococcus pneumoniae*, Legionellen, Mykoplasmen, *Chlamydia pneumoniae* oder Viren verursacht. Bei Risikofaktoren, wie COPD, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Myokardinsuffizienz, Alkoholkrankheit und anderen schweren Grunderkrankungen, muss mit zusätzlichen Erregern gerechnet werden (*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas species* u. a.). Im Krankenhaus erworbene (nosokomiale) Pneumonien werden überwiegend durch gramnegative Erreger verursacht. Leitkeime der nosokomialen Pneumonien sind *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*.

Die antibiotische Behandlung richtet sich initial nach dem wahrscheinlichsten Erreger und der Resistenzlage. Bei Risikofaktoren muss eine vorherige gezielte Materialasservation zur Erregeridentifikation und Resistenzbestimmung durchgeführt werden. Oft besteht als Risikofaktor für das Entstehen einer Pneumonie eine chronische Erkrankung. Der nosokomialen Pneumonie geht meistens die Kolonisation der oberen Atemwege mit Krankenhaus-typischen Erregern wie *Enterobakterien* oder *Pseudomonas*, bei gleichzeitiger Verdrängung der Normalflora, voraus. Es können auch zuvor völlig Gesunde an einer Pneumonie erkranken und auch heute noch daran versterben [1].

Traditionell wurden Pneumokokken-Infektionen mit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Makroliden behandelt. In den letzten Jahren waren jedoch zunehmende Resistenzen



gegenüber diesen Antibiotika, sowie eine ebenfalls zunehmende, häufig Penicillin-Resistenz-assoziierte Multiresistenz der Erreger zu verzeichnen. Die bereits alternativ relativ breit angewendeten Chinolone weisen zwar zur Zeit noch relativ niedrige Resistenzraten auf, jedoch ist auch hier eine deutliche Steigerungstendenz erkennbar [2, 113, 115, 116, 120, 137, 138, 139]. Dies machte die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dringend notwendig, wobei die Ziele höhere Wirksamkeit, breiteres Wirkungsspektrum und langsamere Resistenzentwicklung waren.

Resultat war u. a. die Entwicklung neuer Fluorchinolone mit einer ermutigenden In-vitro-Aktivität gegen viele Pneumokokken, einschließlich Penicillin- und Makrolid-resistenter Isolate [3, 4, 5, 6, 7].

Ebenfalls viel versprechend ist die Weiterentwicklung der Peneme, einer neuartigen Gruppe von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit einem breiten antibakteriellen Spektrum und Stabilität gegenüber vielen  $\beta$ -Laktamasen [104, 105, 106, 107].

Wie man den Tabellen unten entnehmen kann, werden die  $\beta$ -Laktame und die Chinolone auch aktuell zur Therapie der ambulant erworbenen und nosokomialen Pneumonie empfohlen. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der näheren Betrachtung der Wirksamkeit jeweils eines der neueren Vertreter dieser zwei Antibiotika-Klassen, nämlich des C8-Methoxy-Fluorchinolons Gatifloxacin und des Faropenems aus der Familie der Peneme, gegenüber Erregern von Atemwegsinfektionen. Stellvertretend für die vielfältigen Keime, die für Infektionen des respiratorischen Traktes ursächlich sind, werden *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis*, der häufigste und der dritthäufigste Erreger [90, 140], untersucht.

Die Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft empfiehlt folgende Therapie der ambulant erworbenen bzw. der nosokomialen Pneumonie [40, 41]:

Diagnose	Häufigste Erreger	Mittel der Wahl	Alternative n
Ambulant erworbene Pneumonie bei Patienten unter 65 J	S. pneumoniae	Cephalosporin Gruppe 2	Ketolid
Ohne Begleiterkrankungen	H. influenzae	Aminopenicillin+BLI*	Makrolid
Leichte bis mittelschwere Pneumonie	M. pneumoniae	Levofloxacin, Moxifloxacin	Gatifloxacin
	Chlamydia pneumoniae		Doxycyclin

**Tab. 1:**

**Empfehlungen zur rationalen Antibiotika-Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie bei Erwachsenen < 65 Jahre in der Praxis**

\*BLI: Beta-Laktamase-Inhibitor

Diagnose	Häufigste Erreger	Mittel der Wahl	Alternative n
Ambulant erworbene Pneumonie bei Patienten über 65 J	S. pneumoniae	Cephalosporin Gruppe 2/3	Ketolid
Mit Begleiterkrankungen	H. influenzae	Aminopenicillin+BLI	Gatifloxacin
Leichte bis mittelschwere Pneumonie	S. aureus	Levofloxacin, Moxifloxacin	
	Gramneg. Bakterien		
Evtl. initial parenteral behandeln			

**Tab. 2:**

**Empfehlungen zur rationalen Antibiotika-Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie bei Erwachsenen > 65 Jahre in der Praxis**

\*BLI: Beta-Laktamase-Inhibitor

Risikofaktoren	Punktwert
Alter über 65 J	1
Strukturelle Lungenerkrankung	2
Antiinfektive Vorbehandlung	2
Beginn der Pneumonie ab dem 5. Krankenhaustag	3
Schwere respiratorische Insuffizienz mit oder ohne Beatmung (maschinell oder nicht invasiv)	3
Extrapulmonales Organversagen (Schock, akutes Leber- oder Nierenversagen, disseminierte intravasale Gerinnung)	4

**Kalkulierte Initialtherapie der nosokomialen Pneumonie unter Berücksichtigung von Risikofaktoren**

Gruppe I: bis 2 Punkte	Gruppe II: 3 bis 5 Punkte	Gruppe III: 6 Punkte und mehr
Aminopenicillin/BLI	Acylaminopenicillin/BLI	Acylaminopenicillin/BLI oder
Cephalosporin Gruppe 2	Cephalosporin Gruppe 3 b	Cephalosporin Gruppe 3 b oder
Cephalosporin Gruppe 3 a	Cephalosporin Gruppe 4	Cephalosporin Gruppe 4 oder
Fluorchinolon Gruppe 3	Carbapenem Gruppe 1	Carbapenem Gruppe 1 jeweils
Fluorchinolon Gruppe 4	Fluorchinolon Gruppe 2	+Aminoglykosid oder
Carbapenem Gruppe 2	Fluorchinolon Gruppe 3	+Fluorchinolon Gruppe 2** oder
		+Fluorchinolon Gruppe 3 **

**Tab. 3: Punktbewertung von Risikofaktoren bei Patienten mit nosokomialer Pneumonie und Empfehlungen zur kalkulierten Initialtherapie**

\*BLI = Beta-Laktamase-Inhibitor, \*\* = in hoher Dosis

### **1.1.1 Erreger von Atemwegsinfektionen**

#### **1.1.1.1 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* ist der wichtigste Erreger der Lobär- und der Bronchopneumonie. Weiterhin verursacht der Keim die akute Exazerbation der chronischen Bronchitis, die Otitis media, Sinusitiden, die Meningitis, das Ulcus corneae. In schweren Fällen gehen die Infekte häufig mit einer Sepsis einher.

Es handelt sich bei den Pneumokokken um grampositive, ovale bis lanzettförmige Kokken, die meist als Diplokokken oder kurze Ketten vorkommen und von einer dicken Kapsel umgeben sind. Die Kultur auf Blutagar ergibt graue, wenig Eigenfarbe aufweisende, oft schleimige Kolonien, um die sich ein vergrünender Hof, hervorgerufen durch  $\alpha$ -Hämolyse, bildet. Der Schleim stellt die Kapsel dar, die den wichtigsten Virulenzfaktor der Pneumokokken ausmacht, da sie diese vor der Phagozytose schützt. Kapsellose Mutanten bilden Kolonien mit rauer Oberfläche und können keine Krankheiten hervorrufen. Die Kapsel-tragende Form wird als s-Form bezeichnet (s = smooth), die Kapsel-lose als r-Form (r = rough). Durch ihre größere Optochyn-Empfindlichkeit lassen sich Pneumokokken von anderen  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken abgrenzen.

Physiologischerweise besiedelt *Streptococcus pneumoniae* die Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Etwa 40-70% gesunder Erwachsener sind Keimträger. Daher handelt es sich bei Pneumokokkeninfektionen meist um endogene Infekte, die von der eigenen Flora ausgehen. Prädisponierend wirken sich kardiopulmonale Grunderkrankungen, vorausgegangene Infektionen (z. B. Influenza), Milzextirpation, Komplementdefekte aus.

#### **1.1.1.2 *Moraxella catarrhalis***

Bei *Moraxella catarrhalis* handelt es sich um plumpe, oft kokkoide, manchmal auch in Pärchen auftretende Kurzstäbchen. Sie sind Bestandteil der Normalflora des oberen Respirationstraktes. Der Keim kann verantwortlich sein für Pneumonie, akute Exazerbation bei chronischer Bronchitis, Otitis media (bis zu 20% bei Kindern), Sinusitis [8]. Der Erreger wurde lange Zeit als ein harmloser Kommensal des Respirationstraktes und als generell Penicillin-empfindlich betrachtet. Sein pathogenes

Potential wurde in den letzten Jahren jedoch immer deutlicher [63, 65, 66, 69]. Durch retrospektive Studien konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* Isolate vor 1976 keine  $\beta$ -Laktamasen produzierten. Seitdem hat die Zahl an  $\beta$ -Laktamase-produzierenden Stämmen dramatisch zugenommen, so dass heute über 90% aller Stämme eine Penicillinase bilden [8, 72, 80, 90]. Die Expression einer neuen  $\beta$ -Laktamase (BRO) durch dieses Bakterium trat weltweit in etwa gleichzeitig auf [63, 65, 66, 84, 85, 86,]. Mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) konnte man zwei verschiedene BRO  $\beta$ -Laktamase Enzyme in *M. catarrhalis* Isolaten unterscheiden. Man bezeichnete sie als BRO-1 und BRO-2. Substrat- und Hemmungsprofil dieser Enzyme sind identisch. Die Ungleichheit liegt in einer einzigen Aminosäure [87-90]. Die Enzyme unterscheiden sich von anderen bekannten  $\beta$ -Laktamasen gramnegativer Keime durch ihr Substratprofil und den isoelektrischen Punkt und wurden bisher nur in anderen *Moraxella spp.* gefunden [91, 92, 94]. BRO-1 und BRO-2 sind chromosomal codiert und können leicht durch Konjugation übertragen werden [80]. Die Enzyme inaktivieren nicht alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Penicillin, Amoxicillin und Ampicillin werden rasch hydrolysiert, während Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporine bisher praktisch unbeeinflusst bleiben [92, 95, 96, 97, 140]. Die  $\beta$ -Laktamase schützt nicht nur die Bakterien gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, sondern kann zusätzlich auch indirekte pathogenomische Effekte haben. So zeigten etwa Hol et al. durch Experimente [109-111], dass die  $\beta$ -Laktamase die antibiotische Behandlung von begleitenden Infektionen mit gefährlicheren Krankheitserregern, wie z.B. Pneumokokken, zu erschweren vermag. Die meisten *M. catarrhalis* Stämme produzieren die BRO-1  $\beta$ -Laktamase [72], die oft höhere MHK-Werte für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika als BRO-2  $\beta$ -Laktamasen verursacht. Stämme, die BRO-2 produzieren, weisen eine 21 bp-Deletion in der Promotorregion des  $\beta$ -Laktamase-Gens auf, die Bootsma et al als mögliche Ursache für die geringere Enzymproduktion entdeckten [90].

## **1.2 Antibiotika-Therapie und Resistenzentwicklung**

Das Phänomen der negativen Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen, das in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts von Louis Pasteur und anderen als Antibiose definiert wurde, war bereits vor Jahrhunderten, noch vor der Entdeckung von Bakterien und Pilzen, Grundlage der Behandlung von beispielsweise Wundinfektionen mittels

Schimmel in der Volksmedizin. Die wissenschaftliche Erforschung der Infektionen, ihrer Erreger und die Suche nach rational begründeten Therapeutika begann jedoch erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. 1910 Entwickelte Paul Ehrlich das erste Chemotherapeutikum zur Behandlung der Syphilis, das Salvarsan, welches jedoch starke Nebenwirkungen verursachte. Erst 1932 konnte Domagk mit dem Sulfonamid Protonsil das erste wirklich brauchbare Chemotherapeutikum entwickeln. Der große Durchbruch gelang 1940 mit dem Penicillin, dessen Entdeckung auf den Mikrobiologen Flemming zurückgeht. Er hatte durch eine zufällige Verunreinigung einer Bakterienkultur mit dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* dessen bakterizide Wirkung entdeckt. Für die großtechnische Entwicklung von Penicillin gab schließlich die große Zahl von schwer beherrschbaren Wundinfektionen im Zweiten Weltkrieg den unmittelbaren Anlass [9]. Infektionen durch grampositive Kokken und viele andere Erreger konnten nun durch Antibiotika geheilt werden. Eingeschränkt wurden diese viel versprechenden therapeutischen Möglichkeiten jedoch, als man Bakterien isolierte, die gegenüber bestimmten Substanzen unempfindlich, also resistent, waren. Die wichtigsten Resistenzmechanismen sind: inaktivierende Enzyme, resistente Zielmoleküle, reduzierter Influx, gesteigerter Efflux. Man unterscheidet die natürliche Resistenz von der erworbenen. Erstere wird durch bestimmte Eigenschaften einer Bakterienspezies hervorgerufen. Ein Beispiel hierfür ist die Unempfindlichkeit gramnegativer Erreger gegenüber Penicillin. Sie spalten das Antibiotikum durch ihre  $\beta$ -Laktamasen und machen es somit unwirksam. Die erworbene Resistenz betrifft einzelne unempfindliche Stämme einer Spezies, die vorher empfindlich waren, aber durch Änderung ihres Erbguts die Eigenschaft Resistenz erworben haben [8]. Dabei kann es sich molekulargenetisch um eine Mutation, also um eine Veränderung der DNA, handeln, die entweder eine qualitative (strukturelle) oder eine quantitative (regulatorische) Veränderung derjenigen molekularen Zielstruktur nach sich zieht, die für die antibiotische Wirkung verantwortlich ist. Es kann aber auch durch zusätzliche extrachromosomale DNA (z. B. Plasmide, Bakteriophagen) ein genetisches Merkmal hinzugewonnen werden, das für die Resistenz verantwortlich ist. Bei den im Folgenden beschriebenen Resistenzen gegenüber der Antibiotika-Klasse der Chinolone handelt es sich um erworbene Resistenzen.

Als biologischer Grenzwert der Resistenz wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet, ab der ein Stamm als biologisch resistent angesehen wird. Die MHK ist die niedrigste Antibiotikum-Konzentration, ab der, unter standardisierten In-vitro- Bedingungen, eine Hemmung des Wachstums bzw. der Vermehrung einer Bakterienpopulation eintritt [103]. Für den Einsatz der Antibiotika in der Klinik wurde der Begriff der klinischen Resistenz eingeführt. Darunter versteht man das resistente Verhalten von Bakterien gegenüber Konzentrationen von Antibiotika, die im Makroorganismus, am Orte des Infektes, realisiert werden können [8].

Die bakterielle Resistenz drängt die weltweite Forschung zur Entwicklung neuer Substanzen mit besserer Wirksamkeit und breiterem Wirkungsspektrum. Zu den viel erforschten Substanzklassen der letzten Jahre gehören die Chinolone, deren zahlreiche neu entwickelten Vertreter diese Anforderungen erfüllen. Ihr breiteres Wirkungsspektrum umfasst insbesondere auch grampositive Erreger. Die Literaturstellen [10] und [11] liefern eine Übersicht über die Fluorchinolone und ihre Resistenz.

Im Mittelpunkt des Interesses liegt außerdem die Weiterentwicklung der Peneme, einer viel versprechenden Klasse mit einzigartigen antibakteriellen Eigenschaften [104].

### **1.2.1 Chinolone**

#### **1.2.1.1 Stoffeigenschaften und Pharmakodynamik der Chinolone**

Die heutigen Vertreter der Chinolone stellen Weiterentwicklungen der Nalixidinsäure dar, die seit den 60er Jahren bei Harnwegsinfekten angewendet wurde. Sie ist mittlerweile durch wirksamere und verträglichere Stoffe verdrängt worden. Gemeinsames Strukturmerkmal ist eine *Ethylpyridoncarbonsäuregruppe*, die bei Cinoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Perfloxacin, Ofloxacin, und Rosoxacin Teil eines substituierten Chinolonringsystems, bei Enoxacin und Nalixidinsäure eines Naphtyridinrings und bei Pipemidsäure Teil eines Pyrimidopyrimidinrings ist. Die Einführung eines Fluoratoms an C6, z. B. bei den Fluorchinolonen Enoxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin erhöht die Wirkung erheblich, nämlich um das 5-100-fache, so dass zusätzliche Keime in das Wirkungsspektrum fallen [9]. Inzwischen wurden die noch potenteren Chinolone der dritten und vierten Generation entwickelt. Abbildung 1 (Anhang) zeigt beispielhaft Strukturformeln der in dieser Arbeit

untersuchten Fluorchinolone. Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft empfiehlt folgende Einteilung der Fluorchinolone in vier Gruppen [141]:

I. Orale Fluorchinolone mit im wesentlichen auf Harnwegsinfektionen eingeschränkter Indikation	Norfloxacin Perfloxacin*
II. Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation	Enoxacin Ciprofloxacin Ofloxacin Fleroxacin*
III. Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und “atypische” Erreger	Levofloxacin Sparfloxacin* Grepaflox.*
IV. Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und “atypische” Erreger, sowie gegen Anaerobier	Moxifloxacin Gatifloxacin* Trovaflor.*

**Tab. 4: Einteilung der Fluorchinolone nach Gruppen (\* Mittel nicht mehr im Handel)**

Die Chinolone hemmen bei Prokaryonten die Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV und inhibieren so die DNA-Replikation, die Transkription und den DNA-Repair [9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Gyrase und Topoisomerase IV gehören zu der Gruppe der Topoisomerasen Typ II. Sie führen vorübergehende Doppelstrangbrüche in die DNA der Bakterien ein (eine ringförmige Doppelhelix, die als verdrillte Superhelix vorliegt) und ermöglichen das Einfügen eines DNA-Strangs an der Bruchstelle. Die Gyrase erreicht dadurch die negative Überspiralisierung der DNA. So ermöglicht sie, unter Verbrauch von ATP, die Überführung der DNA von einem energieärmeren, relaxierten Zustand in einen energiereicheren, verwundenen Zustand, in dem das Bakterienchromosom überhaupt erst genug Platz in das kleine Volumen der Zelle findet [21, 22, 23]. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV besteht in der Trennung der Tochterchromosomen, der sog. Decatenierung. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Replikation der Bakterienzelle, da die Tochterchromosomen nach einer Replikationsrunde wie die Glieder einer Kette, als sog. Catenane, miteinander verbunden vorliegen. Chinolone verbinden sich u. a. mit der Topoisomerase IV und der DNA zu einem ternären Komplex und verhindern so die Verteilung der Chromosomen



auf die beiden Tochterzellen und damit die weitere Vermehrung des Bakteriums [14, 20, 24, 25, 26, 27].

Gyrase und Topoisomerase IV besitzen nicht nur funktionelle, sondern auch strukturelle Ähnlichkeit. Beide Enzyme bestehen aus jeweils zwei Paaren identischer Untereinheiten A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. Die Untereinheiten der Gyrase werden durch die Gene *gyrA* und *gyrB* codiert, diejenigen der Topoisomerase IV durch die Gene *parC* und *parE*. Die A-Untereinheiten sind vor allem für die Wechselwirkungen der Enzyme mit der DNA, die B-Untereinheiten für die ATP-Bindung verantwortlich. Chinolone binden mit einer hohen Affinität an den Enzym-DNA-Komplex. Es kommt zur Bildung eines ternären spaltbaren Komplexes aus DNA, Enzym und Chinolon, der das Wiederverschließen der Doppelstrangbrüche verhindert [17, 28, 29]. Trifft ein solcher spaltbarer Komplex mit einer Replikationsgabel zusammen, kommt es zu seiner irreversiblen Fixierung. Nach Ablösen des Enzyms von der DNA oder Aufspaltung der Topoisomerasen in ihre Untereinheiten kommt es zur Freisetzung von freien DNA-Enden [13, 14, 28, 30]. Dies löst Streßreaktionen in der Zelle aus, wodurch es letztendlich zum Absterben der Bakterien kommt [14, 31]. Neben diesen letalen Zielstrukturen Gyrase und Topoisomerase IV gibt es zusätzlich nicht-letale Zielstrukturen, mit denen die Chinolone interagieren. Bei gramnegativen Bakterien sind dies Bestandteile der äußeren Membran, wie z. B. Porine. Durch diese wassergefüllten Poren können vor allem hydrophile Chinolone wie Ciprofloxacin hindurchdiffundieren. Weiterhin kommen, sowohl bei gramnegativen, als auch bei grampositiven Bakterien, Effluxproteine der Cytoplasmamembran vor [11].

### ***1.2.1.2 Resistenzmechanismen gegen Chinolone***

Es gibt drei grundlegende Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika:

1. Veränderung der Zielstruktur,
2. Inaktivierung der Substanz und
3. Verringerung der Substanzkonzentration am Wirkungsort

Davon sind für die Klasse der Chinolone nur die Punkte 1 und 3 von Bedeutung, denn für diese Antibiotika als synthetische Substanzen sind noch keine bakteriellen Enzyme bekannt, die sie inaktivieren können (Punkt 2) [11]. Die Ursache für Resistenzen durch

Veränderung der Zielstruktur (Punkt 1) sind Mutationen in den Genen der Gyrase oder Topoisomerase IV. Eine besondere Rolle spielt dabei die “quinolone resistance determining region” (QRDR) der *gyrA* bzw. *parC* Gene [39, 14, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 6, 52- 61, 29, 64, 67, 68]. Von Ince et al wurden jedoch für *Staphylococcus aureus* auch Resistenzmutationen außerhalb der QRDR beschrieben [70, 71]. Die QRDR bei den Typ II Topoisomerasen aller bislang untersuchten Bakterien liegen hochkonserviert vor. Die häufig vorkommenden Resistenzmutationen, die sog. „hot spots“, befinden sich dabei an homologen Positionen. Die häufigsten Mutationen kommen bei *S. pneumoniae* an den Positionen 79 (Ser→Phe, Tyr), 83 (Asp→Asn) und 137 (Lys→Asn) in *ParC* , sowie in *GyrA* an der Position 81 (Ser→Phe, Tyr) vor [39, 44, 49, 51, 6, 18, 58, 61, 73, 64].

Alterationen in den *gyrA* bzw. *parC* Genen haben meistens einen Austausch der Aminosäuren nahe des aktiven Zentrums des Enzyms (Tyr 122 in *E. coli*) und eine geringere Affinität zu Chinolonen zur Folge [76]. Mutationen in *gyrB/ parE* führen meist zu einer gemäßigten Resistenzerrhöhung gegenüber Chinolonen [51, 19] und sind in der Klinik nicht relevant. Die neueren Fluorchinolone, wie z. B. Moxifloxacin, Gatifloxacin oder vor allem Clinafloxacin und Gemifloxacin zeichnen sich durch eine höhere Potenz gegenüber grampositiven Bakterien aus [39, 43, 77, 44, 45, 78, 79, 71, 6, 36, 54].

Je nachdem, welche Bakterienart mit welchem Chinolon behandelt wird, ist die Mutationsfolge in den Topoisomerase-Genen unterschiedlich. Prinzipiell wurde vermutet, die Topoisomerase IV sei immer das primäre Target der Chinolone in grampositiven Bakterien [18, 56, 57]. Pan und Fischer zeigten 1994 jedoch, dass Sparfloxacin in *S. pneumoniae* primär zu Veränderungen der Gyrase führt. Sparfloxacin-vermittelte Mutationen in *gyrA* zeigten sich sofort phänotypisch in Form einer MHK-Erhöhung, während Mutationen im Topoisomerase IV-Gen *parC* erst in Kombination mit einer Mutation in *gyrA* phänotypisch zum Ausdruck kamen und zu einer weiteren MHK-Erhöhung führten [59]. Nachfolgende Arbeiten deuteten darauf hin, dass Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin und Perfloxacin Topoisomerase IV als primäres Target haben, während bei Sparfloxacin und Gatifloxacin Gyrase das primäre Target ist [43, 81]. Das Fluorchinolon Clinafloxacin

scheint beide Zielstrukturen gleichermaßen anzugreifen [60]. Varon et al. waren der Meinung, Moxifloxacin habe ebenfalls *gyrA* und *parC* gleichermaßen als primäres Target [81], offenbar im Widerspruch zu den Ergebnissen von Fukuda et al aus demselben Jahr [43]. Weiterführende Untersuchungen, die sich mit der In-vitro-Hemmung der Enzyme beschäftigten, die man zuvor aus Pneumokokken isoliert hatte, zeigten auf, dass alle getesteten Fluorchinolone die Topoisomerase IV stärker hemmten als die Gyrase [82, 83]. Die Frage des primären Targets in grampositiven Bakterien scheint also noch strittig, wobei alle neueren Arbeiten *parC* als solches sehen [82, 83, 51, 114].

Wie unter Punkt 3 aufgeführt, kann die verminderte Akkumulation des Antibiotikums in der Bakterienzelle zu Resistenzen gegenüber Chinolonen führen. Bei grampositiven Kokken verursachen „multidrug transporters“ diese Verminderung. Dabei handelt es sich um Effluxpumpen vom Typ der „major facilitator superfamily“ (MFS). In *S. pneumoniae* wurde ein solches Effluxprotein mit *PmrA* [93, 37] identifiziert. Multidrug transporter befördern bevorzugt hydrophile Chinolone wie Ciprofloxacin aus der Zelle. Durch gesteigerten Efflux erfährt der MHK-Wert aber nur eine Steigerung um 2-4 Stufen. Das bedeutet, dass dieser Resistenzmechanismus klinisch nur gleichzeitig mit Mutationen in den Genen der Gyrase oder der Topoisomerase IV von Belang ist [99]. Bei *S. pneumoniae* kann schon eine Einzelmutation in einem der Zielstrukturgene *gyrA/ parC* in Kombination mit einer Mutation in *gyrB/ parE* oder mit einem erhöhten Efflux des Chinolons aus der Zelle zu klinischer Resistenz führen. Zu hoher Resistenz führt eine gleichzeitige Mutation in *gyrA* und in *parC* [100, 51].

Für Chinolone mit einer Methoxygruppe an C8 beschrieben Drlica et al. eine langsamere Resistenzentwicklung. Diese Substanzen zeichneten sich durch die gesteigerte Fähigkeit aus, Mutantenwachstum zu verhindern und Mutanten von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium spp.* abzutöten [32, 33, 34, 35, 36, 37, 38]. Durch Chinolone mit einer Methoxygruppe an C8 wurden weniger resistente Mutanten selektiert als durch Chinolone mit einem Wasserstoff an dieser Stelle. Die Ursache für diese erhöhte Aktivität gegen Gyrase- und Topoisomerase IV-Mutanten ist nicht genau bekannt. Studien haben gezeigt, dass die C8-Methoxy-Gruppe sowohl den Angriff auf *gyrA/parC*-Doppelmutanten als auch auf Topoisomerase IV-

Einzelmutanten erleichtert [34, 35, 36]. Das heißt, dass die Methoxygruppe an C8, Chinolonen die Abtötung der Bakterienspezies, in denen Topoisomerase IV das primäre Target ist, erleichtern könnte. Diese Theorie wurde bereits von Drlica et al. eingehend für *S. aureus* beschrieben [36, 38]. Diese Faktoren könnten dazu führen, dass die Resistenzentwicklung gegen C8-Methoxy-Chinolone langsamer vonstatten geht.

## **1.2.2 Peneme**

### **1.2.2.1 Stoffeigenschaften und Pharmakodynamik der Peneme**

$\beta$ -Laktam-Antibiotika sind die weltweit am häufigsten verschriebenen antibakteriellen Mittel. Die ständig zunehmende bakterielle Resistenz gegenüber den alten Vertretern machte die Einführung neuer Substanzen notwendig. So wurde in den späten 70er Jahren eine neue Klasse von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit einem außergewöhnlich breiten Wirkungsspektrum, die Carbapeneme, entwickelt. Die Peneme gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, deren Wirkzentrum der  $\beta$ -Laktam-Ring ist. Zu dieser Gruppe gehören Penicilline, Cephalosporine, Monobactame, Oxapeneme (Clavulansäure), Carbapeneme (Thienamycin), Oxacepheme (Flomoxef), Carbacepheme (Loracarbef). Abbildung 2 (Anhang) zeigt beispielhaft Strukturformeln von  $\beta$ -Laktamen. Sie wirken bakterizid auf proliferierende Bakterien, u. zw. indem sie mit den sog. Penicillin-bindenden-Proteinen (PBP) reagieren. Dabei handelt es sich um Enzyme (Transpeptidasen und Carboxypeptidasen = PBP), die der bakteriellen Zellwandsynthese (Mureinsynthese) dienen und beim Menschen nicht vorkommen. Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika blockieren die Synthese des Mureins, welches die Zelle wie ein Gitternetz umhüllt und ihr Festigkeit und Formbeständigkeit verleiht. In der Wachstumsphase der proliferierenden Bakterien kommt es zum Öffnen des Mureinnetzes an einzelnen Stellen, so dass hier zusätzliches Mureinmaterial eingelagert werden kann. Durch die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wird die Quervernetzung des Mureins jedoch verhindert, so dass klaffende Lücken in der Zellwand entstehen. Dadurch können die Wände dem zunehmenden Druck der wachsenden Bakterienzelle nicht mehr standhalten und es kommt unter Einwirkung von Autolysin zum Zelluntergang bzw. im hypertonen Milieu zur Bildung von fragilen Zellen ohne Zellwand (Protoplasten). Die intrazelluläre Wirkung ist sehr gering. Der Wirkmechanismus erklärt die große therapeutische Breite der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, die nur für Bakterien zytotoxisch sind,

nicht jedoch für tierische Zellen, da diese keine Zellwand besitzen. Die Wirkung findet nur bei proliferierenden Keimen statt, ruhende Zellen bleiben unbeeinflusst (sog. Persister) und können bei zu kurzer Behandlungsdauer unter Umständen Rezidive hervorrufen [8, 9, 108].

Carbapeneme ähneln stark den Penicillinen, nur dass sie im zweiten Ringsystem eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 und ein Kohlenstoffatom anstelle des Schwefels besitzen. Sie wirken stark bakterizid (Angriff aller 6 PBP), sind  $\beta$ -Laktamase-fest und werden ausschließlich parenteral verabreicht. Das erste weiterentwickelte Thienamycin-Derivat, das klinisch erprobt wurde, war das Imipenem (N-Formimidoyl-Thienamycin). Es besaß eine verbesserte chemische Stabilität, hervorragende antibakterielle Aktivität und war, aufgrund der gänzlich synthetischen Herstellung, problemlos in großen Mengen verfügbar. Um die rasche Metabolisation durch die Dehydropeptidase (DHP-1) der Niere zu unterbinden, wurde Imipenem zusammen mit Cilastatin verabreicht, einem reversiblen DHP-1-Inhibitor. Diese Kombination wurde über 15 Jahre lang parenteral zur Behandlung schwerer Infektionen angewendet. Nach der Entdeckung des Imipenems konzentrierten sich die Bemühungen auf die Entwicklung einer einzelnen Substanz mit der gleichen antibakteriellen Potenz bei gleichzeitiger Stabilität gegenüber DHP-1. Man veränderte die C2-Substituenten und erhielt die vollsynthetischen Substanzen Meropenem, Panipenem und Biapenem, mit einer verbesserten antibakteriellen Wirkung. Klinische Anwendung fand bisher nur Meropenem, das sich von Imipenem durch eine verstärkte Wirkung gegen gramnegative Bakterien (*Pseudomonas*), eine schwächere Wirkung gegen grampositive Bakterien (*Staphylokokken*) und seine Stabilität gegenüber DHP-1 unterscheidet. Imipenem/Cilastatin und Meropenem zählen zur Gruppe 1 der Carbapeneme. Zur Gruppe 2 zählt das 2002 neu eingeführte Ertapenem, das eine geringere Wirksamkeit gegen *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. als die anderen Carbapeneme aufweist. Faropenem ist ein neuartiges Penem, das zur oralen Anwendung bei ambulant erworbenen Atemwegsinfektionen entwickelt wurde [8, 41, 48, 55, 107, 108]. Es soll in Form des Prodrug-Esters Faropenem-Daloxat bzw. Faropenem-Medoxomil verabreicht werden und zeigt gute Wirksamkeit gegen grampositive Kokken und gramnegative Erreger, aber nicht gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Es ist aktiv gegen *Streptococcus pneumoniae* Isolate, unabhängig von dem Grad deren Resistenz gegenüber PenicillinG

und ebenso gegen  $\beta$ -Laktamase-produzierende *Enterobacteriaceae*, Anaerobier und andere  $\beta$ -Laktamase-produzierende Erreger von Atemwegsinfekten [105, 106, 107].

### **1.2.2.2 Resistenzmechanismen gegen $\beta$ -Laktame**

Für die Verminderung der Aktivität von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind hauptsächlich drei Mechanismen verantwortlich:

1. strukturelle Veränderungen der PBP-Zielstrukturen
2.  $\beta$ -Laktamase-Produktion
3. reduzierte Permeabilität der Außenmembran

Bei den gramnegativen Bakterien ist die  $\beta$ -Laktamase-Produktion der häufigste Resistenzmechanismus [48]. Im Falle von Streptokokken wird die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktame nicht durch  $\beta$ -Laktamasen vermittelt, sondern durch Veränderungen in den chromosomal kodierten Targetproteinen, den Penicillin-bindenden-Proteinen (PBP). Zur Ausbreitung von Penicillin-Resistenz trägt die Eigenschaft von *S. pneumoniae* und anderen Streptokokken entscheidend bei, homologe PBP-Gene durch Transformation innerhalb einer Spezies, aber auch zwischen verschiedenen Spezies, austauschen zu können.

Homologievergleiche erlauben die Einteilung in drei Klassen von PBP: hochmolekulare (hmm, hmw) PBP der Klasse A und B, und niedermolekulare (lmm, lmw) PBP. Im Allgemeinen werden die hmm PBP als die essentiellen PBP und damit als die wichtigen primären Targets für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika angesehen. Je nach PBP und je nach  $\beta$ -Laktam sind die Antibiotikum-Konzentrationen, mit denen ein PBP inhibiert wird, unterschiedlich. Durch die Alterationen der Target-PBP in *S. pneumoniae*, können diese nunmehr erst bei sehr hohen Antibiotikum-Konzentrationen inhibiert werden; entsprechend höher sind die in-vivo wirksamen Konzentrationen. Einzelne Punktmutationen bewirken dabei nur eine geringe Veränderung der MHK, während hohe Resistenzen, wie sie in klinischen Isolaten beobachtet werden, das Resultat von sehr komplexen Veränderungen sind, die nicht nur ein, sondern mehrere PBP betreffen [62].

### 1.3 Epidemiologie

*Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* gehören zu den drei häufigsten Erreger ambulant erworbener Atemwegsinfekte. Beide Keime zeigen zur Zeit Resistenzen gegenüber den üblicherweise angewendeten Antibiotika. Vor allem die zunehmende Resistenz der Pneumokokken gegenüber Penicillin und anderen Antibiotika, sowie die Multiresistenz vieler *S. pneumoniae* Isolate gegenüber mehreren Wirkstoffklassen sind besorgniserregend [98]. Laut einer Studie von Hoban et al. waren 1999 22% der Pneumokokken in Europa resistent gegenüber Penicillin, 25% gegenüber Erythromycin und 25% gegenüber Tetracyclin, bei steigender Tendenz [102]. Reinert et al. stellten 2003 fest, dass 24,6% europäischer *S. pneumoniae* Isolate Penicillin-unempfindlich und 28,6% resistent gegenüber Makroliden waren [115]. Weltweit erwiesen sich sogar 31,3% der *S. pneumoniae* Stämme, die 1999 - 2004 im Rahmen der PROTEKT Studie von Patienten  $\geq$  65 Jahren mit ambulant erworbenen Atemwegsinfekten asserviert worden waren als Penicillin-unempfindlich (20,2% resistent plus 11,1% intermediär sensibel), 36% als Erythromycin-resistent und 37,2% als resistent gegenüber mehreren Antibiotika [120]. Speziell in den USA und Nordamerika nähern sich die Resistenz-Raten gegenüber Penicillin und Makroliden der 40-50%-Marke [122]. Andererseits betrug die Penicillin-Resistenz bei Pneumokokken in Brasilien 2004 nur 11%, jedoch im Sinne eines deutlichen Anstiegs bezogen auf die Rate von gerade mal 2,9% im Jahre 1998 [116].

Wie Adam et al. für Kanada zeigten stieg die Rate an Ciprofloxacin-Resistenz unter den Pneumokokken signifikant von unter 1% im Jahre 1997 auf 4,2% im Jahre 2005. Die Fluorchinolon-Resistenzen von *S. pneumoniae* sind zur Zeit zwar weltweit noch vergleichsweise niedrig, sie nehmen jedoch stetig zu, wie verschiedene Surveillance Studien belegen [115, 116, 137, 138, 142].

Die Prävalenz an  $\beta$ -Laktamase-produzierenden *Moraxella catarrhalis* Stämmen stieg während der letzten zwei Jahrzehnte kontinuierlich an, nachdem sie 1977 erstmalig nachgewiesen worden war, und heute produzieren mehr als 90% der klinischen Isolate diese Enzyme [90, 95, 148]. Die zwei sehr nah verwandten Enzyme vermitteln nicht nur die Resistenz von *Moraxella catarrhalis* gegenüber Penicillinen und manchen Cephalosporinen, sondern können ebenfalls indirekte pathogene Effekte haben, indem sie die antibiotische Therapie von gleichzeitig bestehenden Infektionen mit

gefährlicheren Keimen, wie z. B. Pneumokokken, blockieren, wie von Hol et al. aufgezeigt wurde [110]. Die weltweite Rate an  $\beta$ -Laktamase-Produzenten ist in den letzten Jahren mit ca. 90 - 95,6% konstant hoch geblieben, so dass die Antibiotika-Resistenz dieser Erreger somit zuletzt also weitgehend stabil geblieben ist [55, 90, 127, 139, 140, 143].

Auf Grund der weltweit zunehmenden  $\beta$ -Laktam- und Chinolon-Resistenzen unter den Pneumokokken, sowie des hohen Maßes an  $\beta$ -Laktamase-Produktion von *M. catarrhalis* werden dringend Therapiealternativen benötigt. Man erhofft sich von den neuesten Entwicklungen in der Klasse der Peneme, wie auch von den neu entwickelten C8-Methoxy-Chinolonen, sie mögen neue, effizientere Therapieoptionen darstellen.

#### **1.4 Zielsetzung**

Die zunehmende Antibiotikaresistenz unter den Erregern von Atemwegsinfektionen limitiert die Therapiemöglichkeiten. Penicillin-resistente *S. pneumoniae* Stämme stellen mittlerweile ein weltweites Problem dar, ebenso die weit verbreiteten  $\beta$ -Laktamase-produzierenden *Moraxella catarrhalis* Stämme [55, s. auch Kapitel „Epidemiologie“]. Daher ist die Einführung neuer, wirksamerer Antibiotika, die keine Resistenzen forcieren, von großer Bedeutung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob das neue C8-Methoxy-Fluorchinolon Gatifloxacin und das neue oral anwendbare Faropenem aus der Klasse der Peneme, tatsächlich wirksamere Alternativen zur Therapie von Atemwegsinfektionen darstellen.

Als zwei der wichtigsten Erreger von Atemwegsinfektionen werden im Speziellen *S. pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* Stämme untersucht. Zunächst wird die Resistenz-Situation unter den vorliegenden Isolaten anhand von MHK-Testungen überprüft. Dazu wird das neue C8-Methoxy-Chinolon Gatifloxacin im Vergleich zu den älteren Fluorchinolonen Ciprofloxacin als Leitsubstanz dieser Antibiotika-Gruppe und Levofloxacin, das als Standardtherapeutikum bei der Behandlung von Pneumokokken-Infektionen in Europa gilt, getestet. Für Faropenem wird Penicillin, die Leitsubstanz der  $\beta$ -Laktame, als Vergleichssubstanz verwendet.



Ferner soll ein Eindruck über den möglichen Verlauf der Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* gegenüber C8-Methoxy-Chinolonen gewonnen werden. Hierzu wird ebenfalls Gatifloxacin im Vergleich zu Ciprofloxacin und Levofloxacin getestet.

Es werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Die Sensibilität klinischer *S. pneumoniae* Isolate aus Europa gegenüber Gatifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin wird bestimmt. Dazu werden die MHK-Werte der Isolate gegenüber Gatifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin getestet und die Mutanten charakterisiert.
2. Die In-vitro-Aktivität und die Resistenzentwicklung bzw. die unterschiedlichen Einflüsse von Gatifloxacin und Ciprofloxacin auf die Selektion von Mutanten werden durch In-vitro-Selektionsexperimente und anschließende Charakterisierung der Mutanten untersucht.
3. Die Empfindlichkeit klinischer Levofloxacin-resistenter *S. pneumoniae* Isolate aus Europa gegenüber Faropenem und Penicillin wird getestet. Die MHK der Isolate gegenüber Faropenem und Penicillin wird ermittelt.
4. Um einen Eindruck der Resistenz gegenüber anderen Erregern von Atemwegsinfektionen zu gewinnen, wird die MHK klinischer *Moraxella catarrhalis* Isolate gegenüber Faropenem und der Vergleichssubstanz Penicillin bestimmt. Zuvor erfolgt die genetische Charakterisierung der vorkommenden BRO  $\beta$ -Laktamasen der Isolate. Weiterhin wird die Empfindlichkeit dieser Isolate gegenüber Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin untersucht. Dazu werden die entsprechenden MHK-Werte bestimmt.

## **2. Material und Methoden**

### ***2.1 Materialien***

#### ***2.1.1 Chemotherapeutika***

Sämtliche Chemotherapeutika lagen in Pulverform vor und wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst und verwendet.

Ciprofloxacin (Cipro)	Bayer AG
Gatifloxacin (Gati)	Grünenthal
Levofloxacin (Levo)	Rhone-Poulenc-Rhorer
Faropenem	Daiichi Asubio Pharma
Penicillin	Bayer AG

#### ***2.1.2 Chemikalien***

Alle Chemikalien wurden mit p.a. Reinheit verwendet.

Agarose	Sigma
EDTA	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Optochinplättchen	Sigma
Tris/HCl/NaCl	Merck

#### ***2.1.3 Lösungen und Puffer***

Acrylamidgel (29:1): 40%ige Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (29:1)  
in Aqua bidest. (29 g Acrylamid, 1g Bisacrylamid)

in Aqua bidest. (29 g Acrylamid, 1g Bisacrylamid)	Sigma
Ammoniumpersulfatlösung =APS (10%ig=100mg/ml)	Ambresco
Blue-Marker	Gibco BGL
Dextranblau (DB)/EDTA: 25 mM EDTA pH 8,0; 50 mg/ml DB	Ambresco
Essigsäure konz.	Merck
Ethanol (absolut)	Riedel de Häen
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	BioRad
Formamid (Verhältnis Formamid: DB/EDTA 5:1)	Ambresco

1 kb DNA Molekulargewichtsmarker	Life Technologies
Koagulasetestlösung	Pharmacia
Mikrobank	Pro-Lab
(mit Kryolösung und porösen Kermik-Mikrosphären)	
PBS, Phosphate (10 mM)-buffered saline (pH 7,3)	
Salzsäure konz.	Merck
TBE-Puffer	Eigenherstellung
(Zusammensetzung: 89mM Tris; 89mM Borsäure; 2,5mM EDTA)	
TE-Puffer pH 8,0	Eigenherstellung
(Zusammensetzung: 10mM Tris/HCl; 1mM EDTA)	
TEMED = N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine	Ambresco
VBS <sup>2+</sup> , Veronal (5 mM)- buffered saline (pH 7,4) mit 0,15 mM Ca <sup>2+</sup> und 0,5 mM Mg <sup>2+</sup>	

#### **2.1.4 Fertig-Kits**

ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Premix)	Perkin-Elmer
API Strep Identifizierungssystem	BioMerieux
Expand High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim
PCR Nucleotide-Mix	Boehringer Mannheim
Quiaquick PCR-Purification-Kit (250)	Quiagen
Terminator Ready RXN-Mix	Perkin-Elmer

#### **2.1.5 Testblättchen**

Nitrocefin (50 µg pro Testblättchen)  
(Cefinase disks, BBL Microbiology Systems Cockeysville, MD, USA)

#### **2.1.6 Nährmedien**

BHI-Agar (37g/l)	Difco
Mueller-Hinton (MH) Bouillon und Agar (pH 7,4) (Agar mit oder ohne Schafsblutzusatz)	Oxoid
Tryptic-Soy-Broth (TSB)	Becton-Dickinson

## 2.1.7 Primer

### 2.1.7.1 Für *Streptococcus pneumoniae*

Alle Primersequenzen für *Streptococcus pneumoniae* wurden nach den in der Gene Bank veröffentlichten Gensequenzen ausgewählt und nach diesen Vorgaben von Pharmacia synthetisiert.

Die Primersequenzen für die einzelnen Gene sind:

PgyrAfw: 5'-CCGTCGCATTCTCTACGGAATGAA-3' und

PgyrArev: 5'-AGTTGCTCCATTAACCAAAAGGTT-3' für *gyrA*

PparCfw: 5'-GTTGGTTCTTTCTCCGTATCG-3' und

PparCrev: 5'-AAGGATAGCAATACTTTTGAC-3' für *parC*

PgyrBfw: 5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC-3' und

PgyrBrev: 5'-TCTGCTCCAACACCCGCA-3' für *gyrB*

PparEfw: 5'-TTCTCCGCTTTCCTCATG-3' und

PparErev: 5'-AGAAGGGTACGAATGTGG-3' für *parE*

### 2.1.7.2 Für *Moraxella catarrhalis*

Für die Sequenzierung der Promotorregion der BRO-Gene wurden die von Bootsma et al. verwendeten Sequenzen angewendet. Diese waren für BRO-1 und BRO-2 identisch.

Primer (GIBCO BRL Custom Primers, Life Technologies):

Forward: 5'-CCTGTGGGACAAGCRAACGG-3'

Reverse: 5'-GTAAAAAATGACGGCGTTGC-3'

## 2.1.8 Geräte

Analysenwaage

Sartorius

Autoklav

Westima-Sauter

DNA Sequenzer 377

ABI Prism

Dr. Lange-Photometer	Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin
Elektrophoresekammern (incl. Zubehör)	Biorad
Glasgeräte	Schott
Grobwaage	Sartorius
Mehrkanalpipetten	BioHit ProLine, Finn
Mikrobank	Pro-Lab
Mikrotiterplatten	Greiner
Mikrotiter-Photometer	Microscan
Multipipetten	Eppendorf, Gillson
Petrischalen	Greiner
Pipetten	Eppendorf, Gillson, Finn
RoboCycler® (Gradient 96 Temperature Cycler with Hot Top Assembly)	Stratagene
Spannungsgerät	BioRad
Spektralphotometer	Dr. Lange
Stempel	Eigenanfertigung AG Heisig
Sterilbank	Bio Gard Hood
Thermocycler	Perkin-Elmer
Thermoschüttler	Eppendorf
Tischzentrifugen	Heraus
Vortexer	Witeg-Elektrik

### **2.1.9 Bakterienstämme**

#### **2.1.9.1 *Streptococcus pneumoniae***

Bei 55 der für die Untersuchung der Resistenzen und der dafür verantwortlichen Mechanismen in *S. pneumoniae*., sowie die Resistenzentwicklungsexperimente verwendeten Bakterienstämme handelt es sich um klinische Isolate, die im Rahmen der SENTRY Surveillance-Studie zwischen 1997 und 2000 gesammelt wurden. Das SENTRY-Programm ist eine langfristig angelegte Surveillance Studie zum Monitoring der häufigsten Krankheitserreger, sowie der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber 26 verschiedenen Antibiotika. Daran beteiligt sind 24 unterschiedliche Universitätskliniken in 13 europäischen Ländern. Nur jeweils ein Isolat pro Patient wird analysiert. Das Referenzzentrum dieser

Studie ist in Utrecht, Niederlande. Bei den resistenten Isolaten werden die Resistenzmechanismen molekularbiologisch charakterisiert.

Außerdem wird der Laborstamm ATCC 49616 (Stamm Nr.1) für die Experimente verwendet.

#### ***2.1.9.2 Moraxella catarrhalis***

Die 412 untersuchten *M. catarrhalis* Isolate stammen allesamt ebenfalls aus der oben genannten SENTRY Surveillance-Studie und wurden 1997 bis 1999 gesammelt. Es handelt sich dabei um Stämme, die aus Atemwegssekreten von Patienten mit ambulant erworbenen Infektionen des Respirationstraktes oder nosokomialen Pneumonien isoliert wurden. Auch hier wird nur ein Isolat pro Patient untersucht.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Messung der optischen Dichte**

Durch die Messung der optischen Dichte kann die ungefähre Zellkonzentration einer Bakteriensuspension ermittelt werden. Die Zellsuspension wird in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer gemessen. Dabei wird der Lichtstrahl, der durch die Küvette tritt, gestreut. Bei konstanter Zellgröße ist dann die Extinktion bis zu einer optischen Dichte von ungefähr 0,3 proportional zur Zellkonzentration; sie folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz. Als Referenz wird das Medium der Bakterien eingesetzt. Die Messung erfolgt bei 600 nm für *S. pneumoniae* und bei 535 nm für *M. catarrhalis*. Je nach Ergebnis der Messung wird die Bakterienkultur zur weiteren Verarbeitung auf das notwendige Maß verdünnt.

### **2.2.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl**

Eine Bakteriensuspension wird in Zehnerschritten bis  $10^{-9}$  in isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Von den Verdünnungsstufen werden je 50 µl auf je ein Viertel einer Agarplatte ausgestrichen.

Die Platten werden 24 h bei 37°C bebrütet und die Kolonienanzahl der einzelnen Verdünnungsstufen ausgezählt. Mit Hilfe der unten genannten Formel wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE/ ml) ermittelt.

$$\text{Keimzahl(KBE / ml)} = \frac{20 * \text{Kolonienzahl}}{\text{Verdünnungsstufe}}$$

### **2.2.3 Methoden zur Identifizierung**

#### **2.2.3.1 *S. pneumoniae***

Optochintest:

Einige Kolonien von einer über Nacht (ÜN) frisch bewachsenen Agarplatte werden in Kochsalzlösung suspendiert. 10 µl Suspension werden gleichmäßig auf einer Agarplatte verteilt. Auf die Platte wird ein Optochin-haltiges Plättchen gelegt und die Agarplatte 24 h unter CO<sub>2</sub> bebrütet. Der Hemmhof muss mindestens 14 mm Durchmesser haben.

### **2.2.3.2 *Moraxella catarrhalis***

Die Identifizierung der Keime erfolgt im Rahmen der SENTRY-Studie nach konventionellen Kriterien [112].

### **2.2.4 Konservierung, Lagerung und Bebrütung**

Die Archivierung aller Isolate (*S. pneumoniae* und *M. catarrhalis*) erfolgt auf Mikrobank, was eine kontaminationsfreie und zuverlässige Konservierung bei unproblematischem Zugriff erlaubt. Bei einer Mikrobank handelt es sich um ein steriles Plastikröhrchen mit Schraubverschluss, gefüllt mit ca. 1 ml flüssigem Kryomedium und 25 Plastik Kügelchen (sog. Mikrosphären) von ca. 1,5 mm Durchmesser mit poröser Oberfläche. Eine Bakterienkolonie wird mit der gut ausgebrannten Öse in das Kryomedium gegeben. Nach Verschließen der Mikrobank wird diese einige Male vorsichtig hin- und hergeschwenkt, wodurch sich die Bakterienzellen fest an die Oberfläche der Mikrosphären anlagern. Anschließend wird das flüssige Kryomedium mit einer sterilen Pipette abgesaugt und das Röhrchen wieder fest verschlossen. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20° bis -70°C. Zur Anzüchtung der Bakterien in Flüssigmedium und Ausstreichen auf Agarplatten genügt eine einzige Mikrosphäre.

Die Bebrütung der Kulturen findet in einem Brutraum bei 37° C, die kurzfristige in einem Kühlraum bei 4° C statt. Zum Ausschluss von Verunreinigungen erfolgt vor jeder Verarbeitung eine mikroskopische Beurteilung der Kolonien.

### **2.2.5 Sterilisation**

Je nach zu sterilisierendem Material kommen drei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Die Dampfdrucksterilisation von Eppendorfcups, Pipettenspitzen, Nährmedien und destilliertem Wasser erfolgt im Autoclav bei 121°C und 1,2 hPa für 20 Minuten. Ebenfalls Dampfdruck-sterilisiert werden infektiöse Abfälle wie benutzte Pipettenspitzen, bewachsene Agarplatten und Nährmedien, etc. Glasgeräte werden nach dem Spülen mittels Hitzesterilisation bei 160°C für 8 Stunden behandelt. Hitzelabile Materialien wie Antibiotika werden mittels Sterilfiltration keimfrei gemacht.

### **2.2.6 MHK-Bestimmung**

#### **2.2.6.1 Mikrodilutionsverfahren**

Eine Übernachtkultur eines Bakterienstamms, hergestellt mit Bakterien von einer bebrüteten Agarplatte oder direkt von einer Mikrobank, wird auf ca.  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  Zellen verdünnt. Die Zelldichte wird dabei photometrisch bestimmt (s. oben).



Es wird eine vierfach konzentrierte Stammlösung des jeweiligen Antibiotikums hergestellt. Die vierfache Konzentration ist notwendig, da die aus der Stammlösung im Laufe der MHK-Bestimmung erhaltenen Verdünnungsstufen durch die Vorlage der Bouillon und die Zugabe der Bakteriensuspension nochmals 1:4 verdünnt werden.

In die MHK- Platten werden pro Vertiefung 100 µl zweifach konzentrierte Bouillon vorgelegt. In die erste Reihe werden 100 µl der Stammlösung zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Dann werden 100 µl dieser Mischung wieder entnommen und in die Vertiefungen der nächsten Reihe gegeben. Man erreicht so eine 1:2 Verdünnung. Durch Pipettieren wird wiederum gemischt, u.s.w. Nur die letzte Reihe wird ausgespart, sie enthält die Wachstumskontrollen. In jedes Loch werden noch 100 µl der verdünnten Bakteriensuspension hinzupipettiert. Die Platte wird ca. 24 h bei 37°C bebrütet. Der MHK-Wert stellt die niedrigste Konzentration des Antibiotikums dar, bei der noch kein sichtbares Wachstum festgestellt werden kann. Für jeden Bakterienstamm werden jeweils zwei Reihen pipettiert, im Sinne eines Doppeltansatzes zwecks besserer Qualitätskontrolle.

#### ***2.2.6.2 Agardilution***

Es werden antibiotikahaltige Platten gegossen, die folgende Konzentrationen aufweisen.

Ciprofloxacin: 2-fache MHK, 4-fache MHK, 6-fache MHK, 8-fache MHK

Gatifloxacin: 2,5-fache MHK, 3-fache MHK, 4-fache MHK

Levofloxacin: 2-fache MHK, 2,5-fache MHK, 3-fache MHK, 4 -fache MHK

Einige Mikrotiterplatten werden mit je 100 µl MH-Bouillon pro Vertiefung beschickt und jede Vertiefung mit einem Mutantenstamm, sowie eine Vertiefung mit dem Wildstamm angeimpft. Die MHK Platten werden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die gleiche Menge MHK-Platten werden mit je 200 µl isotonischer Kochsalzlösung beschickt. Der Stempel wird abgeflämmt, in die Übernachtskulturen eingetaucht und in die entsprechenden Vertiefungen der Kochsalzplatte überführt. Dieser Verdünnungsschritt wird nochmals wiederholt. Anschließend wird der Stempel in die Kochsalzplatten eingetaucht und vorsichtig auf die antibiotikahaltigen Platten gedrückt. Als erste und als letzte Agarplatte wird je eine nicht antibiotikahaltige Platte verwendet, um das Wachstum der Stämme zu überprüfen. Pro Antibiotikakonzentration werden 2 Platten beimpft, um die Sicherheit zu erhöhen, dass nicht durch zufällige Fehler beim Überimpfen das Wachstum eines Stammes nicht erfolgt. Die Platten werden mindestens 24 h bei 37°C bebrütet.

### **2.2.7 Mutantenselektion**

Hierzu werden chinolonhaltige Müller-Hinton (MH)-Agarplatten gegossen. Pro MHK-Stufe werden 20 Platten gegossen. Für die einzelnen Fluorchinolone werden folgende Konzentrationen ausgewählt:

Ciprofloxacin: 2-, 4-, 6- und 8-fache MHK

Gatifloxacin: 2- und 3-fache MHK

Levofloxacin: 2-, 3-, 4-fache MHK

200 ml Übernachtskultur des Wild-Typ (WT)- Stamms werden 20 min bei 10000 upm und 4°C abzentrifugiert und in 15 ml MH-Bouillon resuspendiert. Von dieser Suspension werden je 100 µl auf den antibiotikahaltigen Platten ausplattiert und dann mindestens 48 h bei 37°C bebrütet.

Von den erhaltenen Kolonien auf den Platten werden bis zu 24 Kolonien gepickt und auf MH-Platten mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration erneut ausgestrichen.

### **2.2.8 Agardiffusionstest**

Eine Kolonie des zu untersuchenden *M. catarrhalis* Stamms wird in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und 0,5 ml dieser Suspension auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen wird das entsprechende Testplättchen auf den Agar gelegt. Das Testplättchen besteht aus Filterpapier, das mit dem zu testenden Antibiotikum getränkt ist. Die so präparierten Kulturen werden für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Das Antibiotikum diffundiert in den umliegenden Agar. Abhängig von der Resistenzlage des Bakterienstammes wird dessen Wachstum ab einer bestimmten Antibiotika-Konzentration gehemmt. Entsprechend der konzentrischen Diffusion mit nach außen hin abnehmender Konzentration, findet bei einem sensiblen Bakterienstamm in einem kreisförmigen Bereich um das Testplättchen kein Wachstum statt. Resistente Stämme zeigen sich in ihrem Wachstum unbeeinflusst. Nach der Größe des Hemmhofes und der Grenzwertdichte aus der DIN-Vorschrift (nach DIN 58940) erfolgt die Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R).

### **2.2.9 Testung der $\beta$ -Laktamase-Aktivität von *M. catarrhalis* Isolaten**

Die Testung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität erfolgt durch Anwendung eines kommerziell erhältlichen, konventionellen chromogenetischen Cephalosporin Disk Assay, der Nitrocefin als Substrat enthält (Cefinase disks, BBL Microbiology Systems Cockeysville, MD, USA)

### **2.2.10 Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretischen Verfahren beruhen auf der Wanderung geladener Teilchen einer Lösung, einer kolloidalen Lösung oder einer Dispersion in einem elektrischen Feld. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch geladener Teilchen aufgrund ihrer Ladung oder Größe ergibt Trennungseffekte, die sich analytisch und präparativ ausnutzen lassen.

In diesem Verfahren wandern die negativ geladenen DNA-Stücke wegen ihrer unterschiedlichen Größe mit differierender Geschwindigkeit durch das Agarosegel. Sie können nach Markierung der DNA mit Ethidiumbromid durch UV Licht sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren interkaliert. So kann z.B. kontrolliert werden, ob eine PCR (Polymerasekettenreaktion) oder Aufreinigung einer PCR erfolgreich verlaufen ist (s. unten).

Es werden 1-prozentige Gele verwendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen ist bei gleichbleibender Konzentration der Gele proportional zur angelegten Spannung.

Zunächst wird das Gel gegossen. Dazu wird 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer zum Kochen gebracht und solange gekocht, bis keine Schlieren mehr erkennbar sind. Die Gelschlitten werden in die Gießvorrichtung eingespannt und mit ein oder zwei Slotkämmen versehen. Die aufgelöste Agarose wird mit 20  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt und blasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Das erkaltete Gel wird in die Gelkammer gegeben. Danach wird die Kammer mit soviel TBE- Puffer gefüllt, dass das Gel vollständig bedeckt ist. Zu den Proben aus der PCR bzw. der aufgereinigten PCR werden 4  $\mu$ l Bluemarker hinzugefügt und anschließend in die Slots pipettiert. Der Bluemarker besteht aus Bromphenolblau, das im elektrischen Feld mitwandert und so den Fortschritt der Elektrophorese anzeigt, und aus Glycerin, das die Proben beschwert, so dass sie in den Slots absinken. Zusätzlich wird ein Slot mit 5  $\mu$ l einer Basenpaarleiter als Molekulargewichtsstandard beschickt. Anschließend wird eine Spannung von 80 V angelegt.

### 2.2.11 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Amplifikation (Vervielfältigung) von Genen oder Genabschnitten. Das Prinzip entspricht der in-vivo-Replikation: an einem vorhandenen DNA-Strang wird durch eine DNA-Polymerase ein neuer Strang synthetisiert. Als Startermoleküle braucht die DNA-Polymerase kurze DNA-Abschnitte, die zu den Enden des Gens oder Genabschnittes komplementär sind, sogenannte Primer. Das zu amplifizierende Stück liegt zwischen diesen Primern. Die Primer sollten eine Länge von ca. 22-24 Basenpaaren und ein ausgeglichenes A-T- und C-G- Verhältnis haben. Vor allem muss darauf geachtet werden, dass die Primer keine Schleifen (Palindrome) oder Dimere mit sich selbst bilden können.

Außerdem werden die vier Desoxynucleotide Adenintriphosphat, Thymintriphosphat, Cytosintriphosphat und Guanintriphosphat zugegeben, aus denen die neuen Nukleotidstränge synthetisiert werden. Als Katalysator der Amplifikation dient das Enzym Taq-Polymerase. Dabei handelt es sich um eine sehr hitzestabile Polymerase aus dem *Bacillus thermophilus aquaticus*, die unbeschadet die hohen Temperaturen übersteht, die für das Verfahren erforderlich sind. Das ganze System wird in ein geeignetes Puffersystem mit einer bestimmten Magnesiumchloridkonzentration gegeben. Eine Negativkontrolle wird mitgeführt.

Die PCR besteht aus drei Schritten:

1. *Denaturierung:*

Sie dauert 5 min bei 96°C. Hierbei wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt.

2. *Amplifizierungszyklus:*

Er besteht aus: a) Denaturierungsphase bei 96°C

b) Annealing bei 40-60°C (Anlagerung der Primer)

c) Polymerisation bei 72°C.

Dieser Zyklus wird 25-30 mal wiederholt, pro Zyklus verdoppelt sich die DNA-Menge.

3. *Polymerisation:*

Hier werden alle eventuell noch unvollständigen Stränge vollendet. Dazu wird die Temperatur 10 min bei 72°C gehalten (für 4 min bei *M. catarrhalis*).

Die Reaktion läuft im Thermocycler ab, der den Wechsel zwischen den einzelnen Temperaturen und Haltezeiten automatisch steuert. Nach der Amplifikation werden die DNA-Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese aufgestreut und sichtbar gemacht.

**2.2.11.1 PCR von *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE***

Zur Amplifikation der Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* wird folgender Ansatz verwendet (Einfachansatz, entspricht 50 µl insgesamt):

Wasser :	32,6 µl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.:	5 µl
Puffer-Lsg:	5 µl
dNTP-Mix:	2 µl
Primer:	2 x 2 µl
Taq-Polym.:	0,6 µl

eine *S. pneumoniae* Kolonie von einer frischen Übernachtplatte

Das Temperaturprogramm für die PCR lautet:

<i>Denaturierung</i>		96°C	5 min
<i>Amplifizierung</i> (30 Zyklen)	Denaturierung	96°C	55 sec
	Annealing	55°C	65 sec
	Polymerisation	72°C	70 sec
<i>Endpolymerisation</i>		72°C	10 min

Zur Identifikation wurden 8 µl der PCR Proben durch Gelelektrophorese aufgestreut und anschließend durch UV-Licht überprüft.

**2.2.11.2 PCR von *BRO-1* und *BRO-2***

Zur Amplifikation der Gene *BRO-1* und *BRO-2* wird folgender Ansatz verwendet (Einfachansatz, entspricht 50 µl insgesamt): eine *M. catarrhalis* Kolonie plus:

Wasser (Aqua bidest):	33,4 µl
PCR-Puffer, Expand HF buffer, 10x conc. without MgCl <sub>2</sub> :	5 µl
MgCl <sub>2</sub> stock solution: 25 mM MgCl <sub>2</sub> :	5 µl
PCR Nucleotide Mix	2 µl
Primer	2 x 2µl
DNA-Taq-Polymerase:	0,6 µl

Das Temperaturprogramm für die PCR lautet:

<i>Denaturierung</i>		93°C	2 min
<i>Amplifizierung (30 Zyklen)</i>	Denaturierung	93°C	30 sec
	Annealing	55°C	60 sec
	Polymerisation	72°C	40 sec
<i>Endpolymerisation</i>		72°C	4 min

Zur Identifikation wurden 8 µl der PCR Proben durch Gelelektrophorese aufgestreut und anschließend durch UV-Licht überprüft.

Dieses PCR-Programm entspricht den Angaben von Bootsma et al. [90].

### **2.2.12 Aufreinigung**

Nach der PCR wird das Amplifikat mithilfe des PCR-Purification-Kits von Primern, Öl, Nucleotiden, Salzen und Taq-Polymerase gereinigt.

Das PCR-Produkt wird dabei zunächst in seinem sechsfachen Volumen an PB-Puffer aufgenommen. Die Aufreinigungssäule wird in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt und das Gemisch auf die Säule gegeben. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm wird das Gemisch durch die Säule gezogen. Dabei wird die DNA auf der Säule festgehalten. Die Flüssigkeit im Sammelgefäß wird verworfen und auf die Säulen 750 µl Waschpuffer PE gegeben. Es wird zweimal 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu reinigen, wobei zwischendurch wiederum das Eluat verworfen wird. Anschließend werden die Säulen in Eppendorfgefäße gestellt und die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-NaCl (Elutionspuffer) von der Säule gewaschen. Zur Kontrolle der Aufreinigung werden 4 µl des Produktes durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu lässt man drei Marker verschiedener Konzentration (50 ng/µl, 25 ng/µl, 15 ng/µl) mitlaufen, um von der Helligkeit der Banden auf die DNA-Menge in den Proben schließen zu können. Von den Markern werden 5 µl aufgetragen und die Helligkeit der Banden der Proben mit der Helligkeit 500 Bp-Bande der Marker verglichen.

### 2.2.13 Sequenzierreaktion

Nach der Aufreinigung schließt sich die Sequenzierreaktion an. Diese ist mit einer PCR vergleichbar, jedoch wird nur ein Strang der DNA amplifiziert.

In die Sequenzierreaktion werden normalerweise 50 ng DNA eingesetzt. Die entsprechende Menge an Aufreinigungsprodukt wird über die Helligkeit der Banden wie oben beschrieben ermittelt. Der Ansatz für die Sequenzierreaktion enthält:

- die entsprechende Menge Aufreinigungsprodukt,
- 1 µl des entsprechenden 5'-Primers,
- 4 µl Sequenziermix.

Der Ansatz wird mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Der Sequenziermix enthält das nötige Puffersystem aus Tris-Puffer und MgCl<sub>2</sub>-Lösung, die Taq-Polymerase und farbig markierte dNTP's. Jedes dNTP trägt einen anderen Rhodaminmarker.

#### 2.2.13.1 Temperaturprogramm für die Sequenzierung von *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*

Das Temperaturprogramm für die Sequenzierung lautet:

Denaturierung	96°C	5 min
Denaturierung	96°C	30 sec
Annealing	50°C	15 sec
Polymerisation	60°C	4 min

Die Reaktion läuft über 25 Zyklen. Eine Endpolymerisation ist nicht erforderlich.

#### 2.2.13.2 Temperaturprogramm für die Sequenzierung von *BRO-1* und *BRO-2*

Das Temperaturprogramm für die Sequenzierung lautet:

Denaturierung	96°C	10 sec
Annealing	50°C	5 sec
Polymerisation	60°C	4 min

Die Reaktion läuft über 25 Zyklen. Eine Endpolymerisation ist nicht erforderlich.

### ***2.2.14 DNA-Fällung***

Zur Fällung der DNA werden die aus der Sequenzierreaktion erhaltenen Proben mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. In Eppendorfgefäße werden 250 µl absoluter Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung vorgelegt. Die Proben werden dazu gegeben und das Gemisch 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert und 300 µl 70%-iger Ethanol in die Eppendorfgefäße hinzugefügt, um die DNA umzukristallisieren und von überschüssigen Salzen zu befreien. Nach kurzem Durchmischen auf dem Vortex werden die Ansätze nochmals 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Der restliche Ethanol wird ca. 1 h bei 37°C verdampft. Die gefällte DNA ist auch bei Raumtemperatur sehr stabil, so dass die Proben sich gut konservieren lassen.

### ***2.2.15 Sequenzierung***

Die ausgefällte DNA wird in 4 µl Puffer aufgenommen, der aus deionisiertem Formamid und EDTA besteht. Danach werden die Proben bei 95°C für 2 min erhitzt, um sie zu denaturieren. Die Proben müssen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt werden. Die Proben werden auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Aufgrund der markierten dNTP's des DNA-Stranges kann die Basensequenz detektiert werden. Die Konzentrationen der einzelnen dNTP's werden in einer Kurve aufgezeichnet. Der jeweils höchste Peak gibt an, welche Base sich an dieser Stelle des DNA-Strangs befindet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Resistenz von *S. pneumoniae* gegenüber Chinolonen

##### 3.1.1 Vergleich der Sensibilität klinischer *S. pneumoniae* Isolate aus Europa gegenüber Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Levofloxacin

Es wurden 11 klinische Pneumokokkenisolate aus Europa bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Levofloxacin untersucht. Es handelt sich um 11 Stämme, die 1992 - 2000 isoliert wurden. 7 Stämme wurden aus den Atemwegen bzw. Pleura gewonnen und 4 aus Blut isoliert. Es wurden zunächst die MHK-Werte bestimmt. Anschließend wurde die QRDR der gyrA-, gyrB-, parC- und parE-Gene aller Ciprofloxacin-resistenten Isolate (MHK  $\geq$  4 mg/l) sequenziert,

100% der Stämme waren resistent gegenüber Ciprofloxacin, 18% waren resistent gegenüber Gatifloxacin (MHK  $\geq$  4 mg/l) und nur 9% zeigten Resistenzen gegenüber Levofloxacin (MHK  $\geq$  8 mg/l). Somit zeigte Ciprofloxacin die niedrigste in vitro-Aktivität und Levofloxacin die höchste. Bei sieben der elf Isolate fanden sich sowohl die klassischen Mutationen Asp83→Asn/Tyr und Ser79→Phe/Tyr in parC, als auch die selteneren Alterationen Ser80→Pro und Asp78→Asn. Nur zwei Isolate wiesen die klassische Mutation Ser81→Phe in gyrA auf. Lediglich bei einem einzigen Stamm konnten gleichzeitig Mutationen in parC und gyrA nachgewiesen werden, sowie zusätzlich die sehr seltene Alteration Ser114→Gly in gyrA. Dieser Stamm (SP11) war gleichzeitig der mit Abstand resistenteste gegenüber allen getesteten Fluorchinolonen. Die Rolle des zusätzlichen Aminosäureaustausches Ser zu Gly an Position 114 muß noch bestimmt werden. Bei einem Isolat (SP 1) ließ sich keinerlei Alteration nachweisen, weder in parC noch in gyrA.

Der relativ resistente Stamm SP8 zeigte lediglich die klassische Mutation Ser81→Phe in gyrA, so dass wahrscheinlich scheint, dass weitere Alterationen außerhalb des QRDR der parC-Untereinheit vorliegen.

In den hier untersuchten Pneumokokken-Stämmen fanden sich keine gyrB-Mutationen. Sechs der elf Stämme wiesen die häufig festgestellte Alteration Ile46→Val in parE auf, was jedoch keinen eindeutigen Einfluss auf die MHK-Werte zu haben schien.

Eine Übersicht über die bestimmten MHK-Werte und die Ergebnisse der Sequenzierungen gibt Tabelle 5 (unten).

Stamm	MHK (mg/l)			Mutationen in den Ziel-Enzymen *		
	Ciprofloxacin	Gatifloxacin	Levofloxacin	GyrA	ParC	GyrB
SP1	4	0,5	2	keine	keine	keine
SP 2	4	1	1	keine	Asp83→Asn	keine
SP 3	4	1	1	keine	Asp83→Asn	keine
SP 4	4	1	1	keine	Ser80→Pro	keine
SP 5	4	1	2	keine	Ser79→Tyr	keine
SP 6	8	0,5	2	keine	Asp78→Asn	keine
SP 7	8	1	2	keine	Ser79→Tyr	keine
SP 8	8	4	4	Ser81→Phe	keine	keine
SP 9	16	1	2	keine	Asp83→Tyr	keine
SP 10	16	2	4	keine	Asp83→Asn	keine
SP 11	32	8	16	Ser81→Phe Ser114→Gly	Ser79→Phe	keine

Tabelle 5:

Sensibilität von 11 *Streptococcus pneumoniae* Stämmen gegenüber Fluorchinolonen

\* 6 der 11 Stämme wiesen die häufig festgestellte Alteration Ile46→Val in parE auf

### **3.1.2 Resistenzentwicklung bei 20 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Gatifloxacin und der Vergleichssubstanz Ciprofloxacin**

#### **3.1.2.1 In-vitro-Aktivität und Resistenzentwicklung**

Um mögliche Unterschiede zwischen der Resistenzentwicklung der verschiedenen Chinolone aufzudecken, wurden 20 *S. pneumoniae* Stämme über 10 Tage in subinhibitorischen Konzentrationen von Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin kultiviert. Die MHK-Werte der erhaltenen Mutanten wurden bestimmt. Anschließend wurde die QRDR der gyrA und parC Gene der an Tag 10 erhaltenen Isolate aus der Ciprofloxacin- und der Gatifloxacin-Versuchsreihe sequenziert (s. unten). Für die Analyse der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit wurden die MHK-Werte der ursprünglichen Originalstämme (Zeitpunkt 0) und die der selektierten Mutanten in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Werte zum Zeitpunkt 0 wurden von den folgenden MHK-Werten der Tage 1 bis 10 subtrahiert. Die Steigung des MHK-Anstiegs über die 10 Tage wurde mittels linearer Regression berechnet. Die Ergebnisse der Resistenzentwicklung sind in den Tabellen 6-8 (Anhang) dargestellt.

Gatifloxacin zeigte die höchste Aktivität gegenüber allen Ausgangsisolaten mit MHK-Werten von 0,06 - 4 mg/l, gefolgt von Levofloxacin mit MHK-Werten von 0,5 - 8 mg/l. Im Vergleich dazu zeigten die meisten Isolate eine erniedrigte Sensibilität gegen Ciprofloxacin mit MHK-Werten von 0,25 - 32 mg/l. Die Resistenzentwicklung dreier Isolate gegenüber den jeweils getesteten Chinolonen ist exemplarisch in den Diagrammen der Abbildungen 3 - 5 (unten) dargestellt. Dabei wurde jeweils einer der Stämme mit der schnellsten, einer der Stämme mit der langsamsten und einer der Stämme mit einer mittleren Resistenzentwicklung ausgewählt. Die Abbildung 6 (unten) gibt schließlich die Mittelwerte der drei getesteten Chinolone im direkten Vergleich wieder.

Die Versuche zeigten, dass es immer zu einer Resistenzentwicklung kam, unabhängig von der In-vitro-Aktivität gegenüber den Ausgangsisolaten. Zwar zeigen Gatifloxacin und Levofloxacin eine etwas langsamere Resistenzentwicklung als die Leitsubstanz Ciprofloxacin, jedoch führen auch diese Mittel über 10 Tage zu einer erheblichen Resistenz. Aufgrund der stark begrenzten Datenlage, lässt sich jedoch kein allgemeingültiges Fazit formulieren.

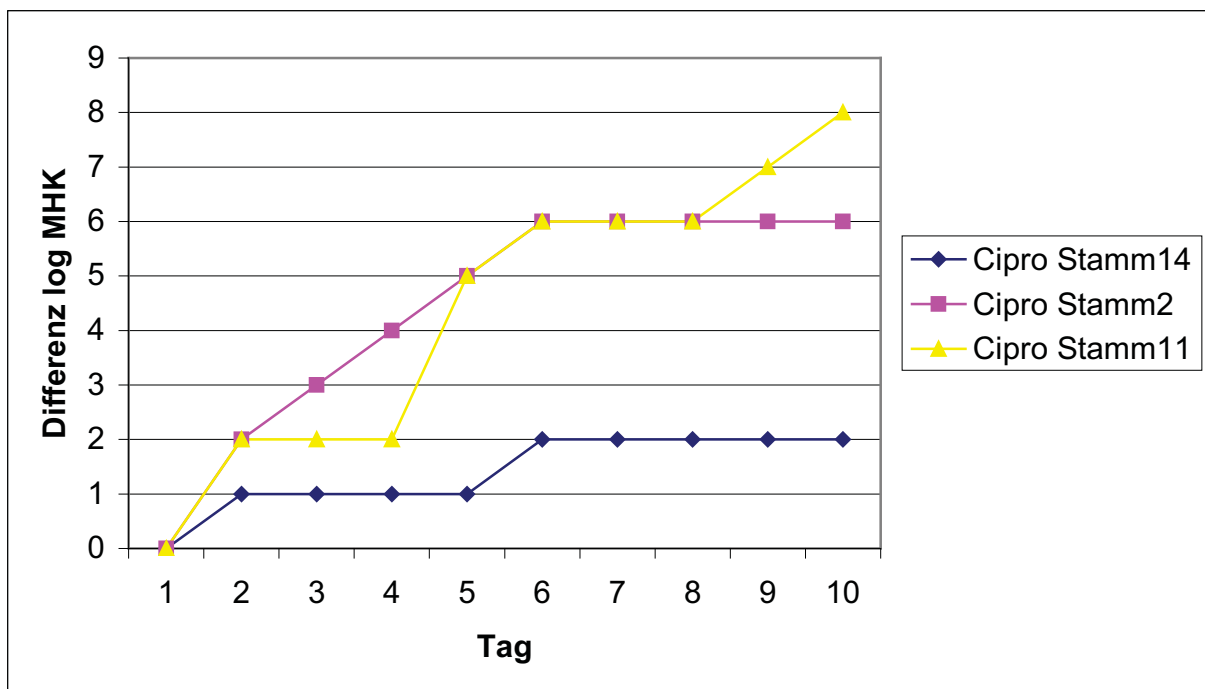


Abb.3: Resistenzentwicklung von 3 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Ciprofloxacin. Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangswerten über 10 Tage

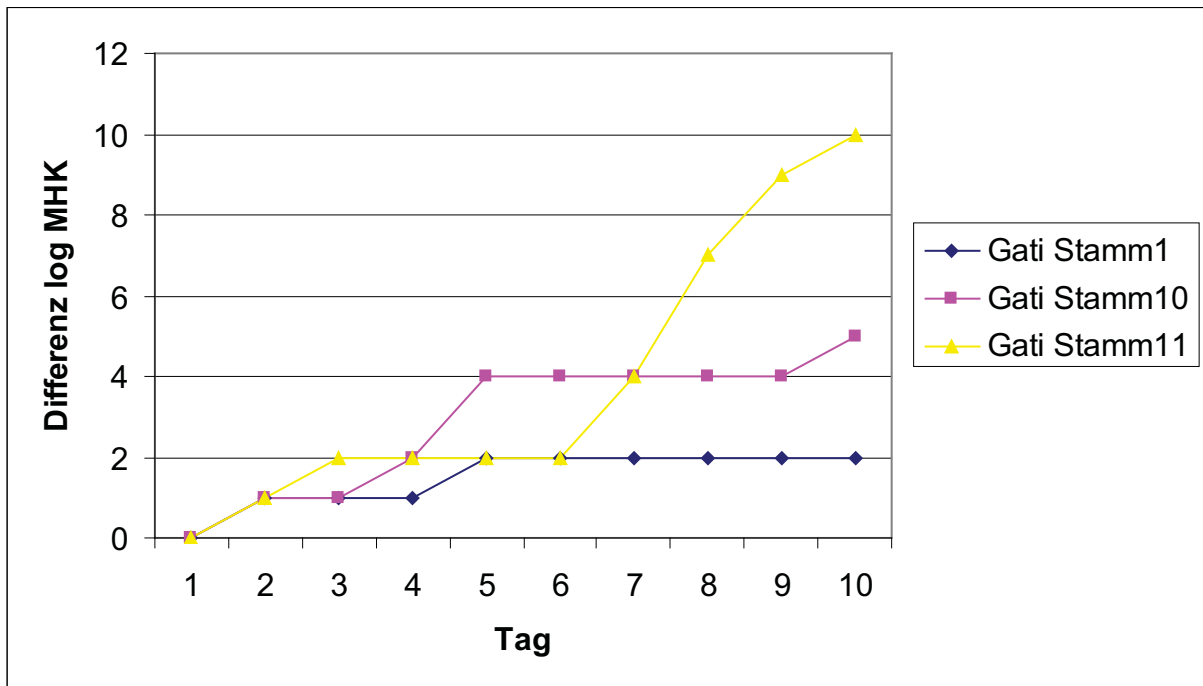


Abb.4: Resistenzentwicklung von 3 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Gatifloxacin.  
Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangswerten über 10 Tage

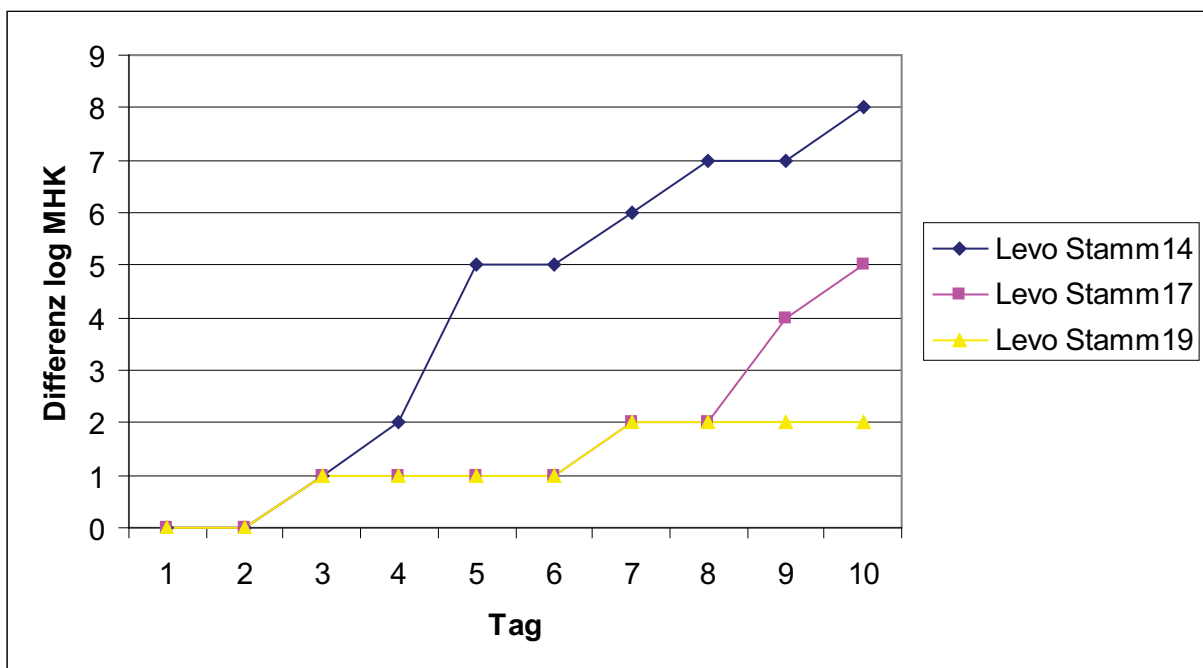


Abb.5: Resistenzentwicklung von 3 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Gatifloxacin.  
Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangswerten über 10 Tage

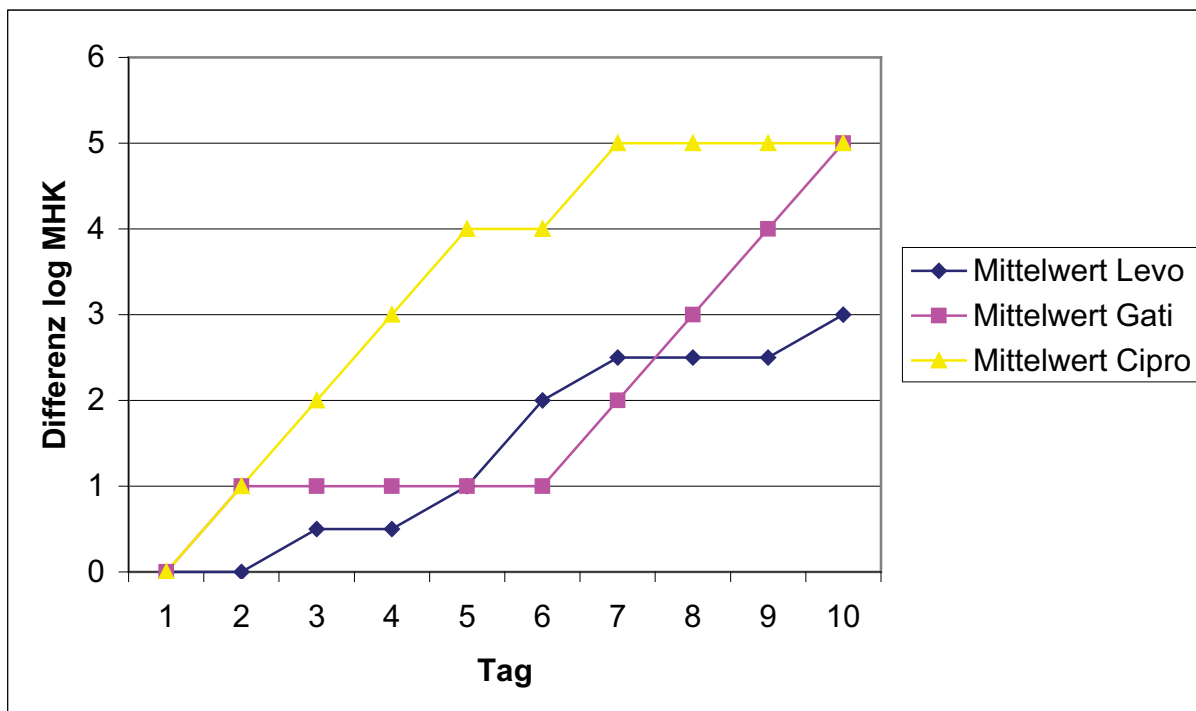


Abb.6: Mittelwerte der Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber den drei getesteten Chinolone im direkten Vergleich. Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangswerten über 10 Tage

### 3.1.2.2 Charakterisierung der selektierten Mutanten von 6 Stämmen *S. pneumoniae*

Die nach 10 Tagen Selektion unter Antibiotikadruck (von Cipro- und Gatifloxacin) entstandenen Mutanten wurden gesammelt und mit insgesamt 6 verschiedenen Chinolonen (Cipro-, Gati-, Clina-, Gemi-, Moxi- und Sparfloxacin) inkubiert. Die entsprechend bestimmten MHK-Werte für 6 Pneumokokkenstämme sind in Tabelle 9 (Anhang) dargestellt und zeigen ganz unterschiedliche Resistenzen gegenüber den anderen Chinolonen.

Weiterhin wurden die an Tag 10 isolierten Cipro- und Gatifloxacin-Stämme sequenziert, um Veränderungen in den QRDR von Topoisomerase IV und Gyrase im Vergleich mit den Ursprungstämmen zu untersuchen und mögliche Resistenzmutationen zu ermitteln. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 9 zusammengefasst, u. zw. in direktem Vergleich mit den jeweiligen MHK-Werten und der Zunahme an MHK-Stufen gegenüber den Ausgangsstämmen.

Es fällt auf, dass die Resistenzentwicklung nicht Antibiotika- sondern vielmehr Stamm-spezifisch ist und somit erheblich variiert. Trotzdem kann man sagen, dass Gatifloxacin im Hinblick auf die Ursprungs-Stämme eine höhere Aktivität als die Leitsubstanz Ciprofloxacin zeigte mit MHK-Werten von 0,06 bis 0,25 gegenüber 0,25 bis 1 mg/l. Was die Resistenzent-

wicklung angeht, lässt sich, an den MHK-Stufen nach 10 Tagen gemessen, kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen erkennen. Clina-, Gemi- und auch Moxifloxacin weisen insgesamt die niedrigsten MHK-Werte bei den Tag 10-Mutanten auf und somit die höchste Aktivität. Die begrenzte Datenlage erlaubt jedoch keine allgemeingültige Schlussfolgerung, so dass weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Isolaten notwendig sind, um entscheiden zu können, ob die Resistenzentwicklung, vor allem für die C8-Methoxy-Chinolone, stammspezifisch oder in Abhängigkeit von der chemischen Struktur des Antibiotikums verläuft.

Wenn man sich die Sequenzierungsergebnisse der an Tag 10 isolierten Cipro- und Gatifloxacin-Stämme anschaut, stellt man fest, dass hauptsächlich die klassischen Alterationen in *gyrA* und in *parC*, nämlich der Austausch der Aminosäuren Ser zu Phe oder Tyr an Position 81 (*gyrA*) respektive Ser79- $\square$ Tyr oder Phe und Asp83- $\square$ Gly (*parC*) für die Resistenz der meisten Isolate verantwortlich zu sein scheinen. Mutationen in *gyrB* und *parE* scheinen keine signifikanten Auswirkungen auf die MHK-Werte zu haben. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen [6, 18, 43, 49, 51, 57-60, 61, 81].

### 3.2 Resistenz von *S. pneumoniae* gegenüber $\beta$ -Laktamen

#### 3.2.1 Empfindlichkeit klinischer Levofloxacin-resistenter *S. pneumoniae* Isolate aus Europa gegenüber Faropenem und Penicillin

Um die In-vitro-Aktivität des Faropenems, eines neuen, zur oralen Anwendung bestimmten Penems gegenüber *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen, die bereits gegenüber anderen Antibiotika-Klassen resistent sind zu überprüfen, wurden 25 klinische Isolate mit erniedrigter Levofloxacin-Sensibilität ( $\text{MHK} \geq 2 \text{ mg/l}$ ) ausgesucht, die Mutanten charakterisiert und anschließend die MHK gegenüber Faropenem und der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Leitsubstanz Penicillin bestimmt. Es handelt sich um Stämme, die bei Bakteriämien, ambulant erworbenen Atemwegsinfekten und nosokomialen Pneumonien deutschlandweit isoliert wurden.

10 von 16 Stämmen mit einem Levofloxacin-MHK  $\geq 4 \text{ mg/l}$  wiesen in *parC* die Mutation Ser79→Phe auf, 6 von 16 die Alteration Asp83→Asn. Alle 16 Stämme mit einem  $\text{MHK} \geq 4 \text{ mg/l}$  wiesen in *gyrA* an Position 81 den Aminosäureaustausch Ser zu Phe oder Ser zu Tyr. Keine dieser Alterationen ließ sich in den neun Isolaten mit einem MHK von 2 mg/l nachweisen.

Anschließend wurden die MHK-Werte dieser Isolate gegenüber Faropenem und Penicillin bestimmt. Die genauen Werte im Vergleich gibt Tabelle 10 wieder.

Antibiotikum	MHK-Werte in mg/l		
	MHK50	MHK90	Minimal-Maximal-Bereich
Penicillin	$\leq 0,015$	2	0,015-2
Faropenem	0,06	0,25	0,008-0,5

Tabelle 10: Wirksamkeit zweier  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gegenüber 25 *S. pneumoniae*-Stämmen mit erniedrigter Levofloxacin-Sensibilität

Wie man anhand der Ergebnisse sehen kann, war Faropenem das wirksamere Antibiotikum mit einem  $\text{MHK}_{90} \leq 0,25$ . Der höchste MHK-Wert betrug 0,5 mg/l, so dass davon auszugehen ist, dass alle Isolate Faropenem-sensibel waren. Faropenem hatte somit signifikante Wirksamkeit gegenüber nachgewiesenermaßen Levofloxacin-unempfindlicher *S. pneumoniae*-Stämme.

### **3.3 Resistenz von *Moraxella* gegenüber Chinolonen und $\beta$ -Laktamen**

#### **3.3.1 Sensibilität klinischer *Moraxella catarrhalis* Isolate gegenüber Faropenem und der Vergleichssubstanz Penicillin, sowie gegenüber den Chinolonen Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin**

Um einen Eindruck der Resistenzen anderer Erreger von Atemwegsinfektionen gegenüber den bisher untersuchten Antibiotika zu gewinnen, wurde die MHK klinischer *Moraxella catarrhalis* Isolate gegenüber Faropenem und der Vergleichssubstanz Penicillin bestimmt. Zuvor erfolgte die genetische Charakterisierung der vorkommenden BRO  $\beta$ -Laktamasen der Isolate. Weiterhin wurde die Empfindlichkeit dieser Isolate gegenüber Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin untersucht. Dazu wurde ebenfalls die MHK bestimmt.

Es wurden 412 *M. catarrhalis* Stämme untersucht, die zwischen 1997 und 1999 in 13 Ländern aus Atemwegs-Sekreten von Patienten mit ambulant erworbenen Infektionen des Respirationstraktes oder nosokomialen Pneumonien als Teil der europäischen SENTRY Studie isoliert worden waren.

Die Ergebnisse der genetischen Charakterisierung der BRO  $\beta$ -Laktamasen und die bestimmten MHK-Werte sind in Tabelle 11 (unten) und 12 (Anhang) zusammengefasst.

Von den 412 Isolaten waren 380 (92,2%)  $\beta$ -Laktamase-positiv. Diese ließen sich unterteilen in 359 (94,5%) BRO-1- $\beta$ -Laktamase- und nur 21 (5,5%) BRO-2- $\beta$ -Laktamase-Stämmen. 32 (7,8%) Stämme waren  $\beta$ -Laktamase-negativ.  $\beta$ -Laktamase-Produktion wurde ähnlich häufig in Isolaten aus nosokomialer und ambulant erworbener Pneumonie beobachtet. Wie erwartet, gaben alle  $\beta$ -Laktamase-negativen Isolate auch negative Resultate im PCR Screening von BRO-1 und BRO-2. Die 21 bp-Deletion ließ sich in allen Sequenzen der BRO-2-enthaltenden Isolate nachweisen, jedoch keine zusätzlichen neuen Deletionen/Insertionen.

Faropenem zeigte eine gute, im Vergleich zu Penicillin sogar die bessere Wirksamkeit, ohne Hinweise für Resistenzen bei maximalen MHK-Werten von 1 mg/l. Die BRO-1 produzierenden Stämme wiesen jedoch sowohl für Penicillin als auch für Faropenem deutlich höhere MHK-Werte auf als die BRO-2-Stämme, so dass von einer verstärkten Resistenz dieser Stämme auszugehen ist.

Alle getesteten Chinolone zeigten eine gute In-vitro-Aktivität ohne Hinweise für Resistenzen bei maximalen MHK-Werten von 1 mg/l. Am wirksamsten war Gatifloxacin mit einem maximalen MHK von 0,25 mg/l. Was die Chinolone angeht, verursachte die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein von  $\beta$ -Laktamase, unabhängig vom jeweiligen Enzym-Typ, keinen signifikanten Unterschied in der antibiotischen Wirksamkeit (weitgehend identische MHK-Werte für alle 412 Isolate gegenüber dem jeweilig getesteten Chinolon).



Phäno-/ Genotyp	Antibiotikum - MHK (mg/l)					
	Penicillin			Faropenem		
	MHK50	MHK90	Minimal- Maximal- Bereich	MHK50	MHK90	Minimal- Maximal- Bereich
β- Lactamase negativ (n=32)	≤ 0,03	0,25	≤ 0,03 - 0,05	0,03	0,25	0,03 - 0,25
β- Lactamase positiv -BRO-1- (n=359)	4	>4	≤ 0,03 - >4	0,12	1	0,03 - 1
β- Lactamase positiv -BRO-2- (n=21)	1	>4	0,25 - >4	0,03	0,25	0,03 - 0,5

Tabelle 11: Sensibilität von *Moraxella catarrhalis* gegenüber Faropenem und der Vergleichs-  
substanz Penicillin

#### **4. Diskussion**

Nach wie vor gehören ambulant erworbene Atemwegsinfektionen zu den häufigsten Erkrankungen in der westlichen Welt. Viren sind dabei weit häufiger für die Infektionen verantwortlich, in deutlicher Entfernung gefolgt von Bakterien, die typischerweise den respiratorischen Trakt befallen. Die Tatsache, dass weder die Klinik noch die diagnostischen Maßnahmen den Medizinern erlauben, eine bakterielle Infektion mit Genauigkeit zu identifizieren, ist die Hauptursache für die Verschreibung unnötiger Antibiotika und die daraus resultierende Resistenzentwicklung; die gesteigerte Toxizität und die ebenfalls gesteigerten Kosten. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* sind die häufigsten Erreger ambulant erworbener Atemwegsinfekte. Alle drei Keime zeigen zurzeit Resistenzen gegenüber den üblicherweise verschriebenen Antibiotika, allerdings in unterschiedlichem Maße und zum Teil regional verschieden. Die Behandlung ambulant erworbener Atemwegsinfekte sollte immer eine adäquate Abdeckung von *Streptococcus pneumoniae* beinhalten, zum Einen da dieser Keim den häufigsten bakteriellen Erreger darstellt, oftmals mit Todesfolge, zum Anderen weil er über die Zeit die meisten Resistenzmechanismen angehäuft hat. Die zunehmende Resistenz der Pneumokokken gegenüber Penicillin und anderen Antibiotika, sowie die beunruhigende Multiresistenz vieler Isolate gegenüber mehreren Wirkstoffklassen erschwert die Behandlung von Atemwegsinfekten [98]. Genauere Angaben zu aktuellen Penicillin-Resistenz-Raten und der Resistenzentwicklung gegenüber dieser Wirkstoffklasse in den letzten Jahren bietet das Kapitel „Epidemiologie“ in der Einleitung dieser Arbeit. Traditionell wurden *S. pneumoniae*-Infektionen mit Penicillinen und Makroliden behandelt. Auf Grund der zunehmenden Resistenzen gegenüber diesen beiden Wirkstoffklassen wurden die neuen Fluorchinolone zur Behandlung von Penicillin- und mehrfachresistenten *S. pneumoniae* empfohlen. Fluorchinolon-Resistenz war zwar lange Zeit niedrig, nahm in den letzten Jahren jedoch zu. Wie Adam et al. für Kanada zeigten, stieg die Rate an Ciprofloxacin-Resistenz signifikant von unter 1% im Jahre 1997 auf 4,2% im Jahre 2005. Auch gegenüber der weiterentesteten Chinolone Gati-, Gemi-, Levo- und Moxifloxacin waren signifikante Anstiege der Resistenz-Raten auf aktuell 1,6%, 1,0%, 1,1% bzw. 1,0% zu verzeichnen [113]. Die Rate der Ciprofloxacin-Resistenz war am höchsten bei Patienten älter als 65 Jahre und am niedrigsten bei Patienten unter 16 Jahren, was durch den umfangreichen Einsatz der Fluorquinolone zur Behandlung älterer Patienten erklärt sein wird, während Gyrasehemmer bei Kindern in der Wachstumsphase (< 18 Jahre) kontraindiziert bzw. stark anwendungsbeschränkt sind [113, 138, 144]. Die Ergebnisse der Kanadischen Studie spiegeln weitgehend die aktuelle weltweite

Situation bezüglich der Chinolon-Resistenzen wider, wie man den Arbeiten von Karlowsky und Reinert entnehmen kann [115, 138]. Das heißt, die Fluorchinolon-Resistenzen sind zur Zeit noch vergleichsweise niedrig, sie nehmen jedoch weltweit stetig zu, und zwar umso mehr, je mehr der regionale Verbrauch an Wirkstoffen dieser Klasse steigt. So sind vermutlich auch die zum Teil großen Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der Resistenzen zwischen verschiedenen Ländern und sogar zwischen unterschiedlichen Gebieten desselben Landes zu erklären. Während die Levofloxacin-Resistenz (MHK  $\geq 4$  mg/l) in Österreich, der Schweiz, Deutschland, Belgien, Frankreich, Spanien, Portugal und Italien in der genannten Reihenfolge von 0% bis 1,3% rangierte und auch in Brasilien Levo- und Gatifloxacin-Resistenzen nur bei 0,2% der Studien-Isolate zu verzeichnen waren, erreichten manche Gegenden Spaniens Fluorchinolon-Resistenzen von 5%, Irland von 15,2% und Hong Kong sogar von 17,8% [114, 115, 116]. In den USA war eine Verdoppelung der Ciprofloxacin-Resistenz von 1,2% im Zeitraum 1999/2000 auf 2,7% in den Folgejahren 2001/2002 zu verzeichnen [142], und auch 2002/2003 blieb die Rate mit 2,3% etwa stabil hoch [145]. Karlowsky et al. fanden anhand eines riesigen Kollektivs von 27.828 Pneumokokken, die 1998-2002 im Rahmen des TRUST Surveillance Programms in den Vereinigten Staaten gesammelt worden waren heraus, dass Penicillin-Resistenz in einem hohen Maße mit Koresistenzen gegenüber anderen Antibiotika, vornehmlich Trimethoprim/ Sulfamethoxazol und dem Makrolid Azithromycin, aber zu einem geringen Grad auch gegenüber Levofloxacin, assoziiert war [138].

Der Anstieg der Fluorchinolon-Resistenzen bei gram-positiven Erregern in den letzten Jahren veranlasste die Pharmaindustrie dazu, neue Fluorchinolone mit größerer Wirksamkeit gegen diese sich rasch verändernden Keime zu entwickeln. Strukturelle Veränderungen des Grund-Fluorchinolon-Nucleus führten zu mehreren neuen Wirkstoff-Generationen. Dabei verbesserte sich die Wirksamkeit gegenüber vielen gram-positiven Erregern, inklusive *S. pneumoniae*, mit jeder neuen Generation [114].

Jones et al. verglichen die Wirksamkeit von Gatifloxacin und Levofloxacin gegenüber eines riesigen Pneumokokken-Kollektivs von 10.978 Stämmen, die 1997 bis 2000 weltweit gesammelt worden waren und konnten zeigen, dass Gatifloxacin gegenüber diesen Keimen zwei bis vier Mal wirksamer war als Levofloxacin. In Europa z. B. trat nur zu 0,2% Levofloxacin-Resistenz auf, Gatifloxacin-Resistenz sogar nur zu 0,1%. Die MHK<sub>90</sub>-Werte betragen in Europa für Levofloxacin 1 mg/l und für Gatifloxacin 0,5 mg/l [121]. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten der Sensibilitätsprüfung von 20 *S. pneumoniae* Isolaten dieser Arbeit, die eine durchschnittliche MHK für Levofloxacin von 1,1 mg/l und von 0,4 mg/l für Gatifloxacin ermittelte. Die vorliegenden Resultate zeigen weiterhin eine Reihenfolge der Wirksamkeit der

getesteten Fluorchinolone von Gatifloxacin > Levofloxacin > Ciprofloxacin, entsprechend anderer Arbeiten [114, 146, 147]. Das könnte auf die größere Potenz der neueren Fluorchinolone-Generationen und die verbesserte Stabilität des ternären Gyrase-Topoisomerase-IV-DNA-Komplexes zurückzuführen sein [114].

Wie aktuelle Arbeiten zeigen, wird Fluorchinolone-Resistenz bei Pneumokokken durch zwei übliche Mechanismen vermittelt, nämlich zum Einen durch chromosomale Mutationen in den QRDR von Topoisomerase IV (*parC* und *parE*) und Gyrase (*gyrA* und *gyrB*), sowie zum Anderen durch aktiven Efflux [113]. Topoisomerase IV- und Gyrase-vermittelte Resistenzen können zwar gemeinsam auftreten, aber neuere Arbeiten belegen, dass bei Pneumokokken die Alterationen in *parC* immer denen in *gyrA* vorangehen [82, 83, 51, 114], nachdem die Frage des primären Targets der Chinolone in grampositiven Bakterien lange Zeit strittig schien, wie die zum Teil widersprüchlichen Aussagen verschiedener Autoren zeigen [18, 43, 56, 57, 59, 81]. Die Resistenz entwickelt sich schrittweise mit einem zunehmend höheren MHK im Falle gleichzeitiger Anhäufung mehrerer Resistenz-verleihender Mutationen. Alterationen in *gyrA* entstehen typischerweise nicht in Abwesenheit von *parC* Mutationen [114]. Bei Ciprofloxacin-resistenten Stämmen ließen sich am häufigsten Alterationen sowohl in *parC* als auch in *gyrA* nachweisen. Am zweithäufigsten waren alleinige *parC* Mutationen. Diese Arbeit bestätigte obige Erkenntnisse. Weiterhin wurden auch in dieser Arbeit überwiegend die üblichen Resistenzmutationen an den „hot spots“ gefunden [6, 19, 43, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 54, 57-61, 67, 68, 113-115, 119], nämlich der Austausch von Aminosäuren an den Positionen 79 (Ser→ Tyr, Phe oder Ala) und 83 (Asp→ Asn oder Gly) in *parC*, sowie an Position 81 (Ser→ Tyr, Phe) in *gyrA*. Am zweithäufigsten war in *parC* der Aminosäureaustausch Lys137→ Asn, einmal auch in Kombination mit Ser79→Tyr und Asp83→Gly. Die Alteration Lys137→ Asn, die als weit verbreitet unter Europäischen Isolaten gilt wurde im Rahmen der internationalen SENTRY Studie (1997 - 2003) auch bei mehrfach Antibiotika-resistenten *S. pneumoniae* Stämmen nachgewiesen. Da sie jedoch ebenfalls bei Levofloxacin-sensiblen Stämmen in Korea detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass ihr Effekt auf die Fluorchinolone-Resistenz niedrig ist [115].

Da der relativ resistente Stamm SP8 lediglich den klassischen Aminosäureaustausch von Ser zu Phe an Position 81 aufwies, war zu vermuten, dass weitere Alterationen außerhalb des QRDR der *parC*-Untereinheit vorliegen. Die Arbeit von Adam et al. unterstützte die Hypothese, Mutationen außerhalb der QRDR seien mit Fluorchinolone-Resistenz assoziiert, jedoch nicht. Sie konnten keine Mutationen außerhalb der QRDR identifizieren, die mit erhöhten Ciprofloxacin-MHK-Werten korrelierten. [113].

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Pneumokokken-Stämmen fanden sich keine *gyrB*-Mutationen. Sechs der elf Ciprofloxacin-resistenten Stämme wiesen die häufig festgestellte Alteration Ile46→Val in *parE* auf, was jedoch keinen eindeutigen Einfluss auf die MHK-Werte zu haben schien. Die Bedeutung von *parE*- und *gyrB*-Mutationen bei der Fluorchinolone-Resistenz bleibt unklar. Frühere Autoren haben diesen Alterationen bei Stämmen mit verringerter Sensibilität gegenüber Fluorchinolonen keine Bedeutung zugemessen [18, 98, 119]. Bezüglich der Resistenzentwicklung konnte die Kultivierung von 20 *S. pneumoniae* Stämmen über 10 Tage in subinhibitorischen Konzentrationen von Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin in dieser Arbeit zeigen, dass es immer zu einer Resistenzentwicklung kam, unabhängig von der In-vitro-Aktivität gegenüber den Ausgangsisolaten. Zwar boten Gatifloxacin und Levofloxacin eine etwas langsamere Resistenzentwicklung als die Leitsubstanz Ciprofloxacin, jedoch führten auch diese Mittel über 10 Tage zu einer erheblichen Resistenz. Außerdem wiesen die selektierten Mutanten zum Teil Kreuzresistenzen gegenüber den anderen getesteten Chinolone mit auffällig stark erhöhten MHK-Werten auf. Aufgrund der stark begrenzten Datenlage, lässt sich jedoch kein allgemeingültiges Fazit formulieren. Auch

De Azavedo et al. zeigten kürzlich anhand eines klinischen *S. pneumoniae* Isolates das unweigerliche Auftreten von Resistenzen und den damit verbundenen Mutanten nach Kultivierung des Keimes über mehrere Tage in Anwesenheit der Chinolone Gemi-, Gati- und Moxifloxacin [118].

Schmitz et al. konnten an einer statistisch signifikanten Anzahl von 70 *S. pneumoniae* Stämmen sowohl obige Ergebnisse dieser Arbeit, als auch die Aussage anderer Autoren bestätigen, die an wenigen ausgewählten Isolaten gezeigt hatten, dass die Molekularstruktur der C8-Position die antibakterielle Aktivität einer Substanz erhöhen und möglicherweise die Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit reduzieren könnte [35, 117].

Die klinische Relevanz der in dieser Arbeit in-vitro erlangten Resultate muss durch entsprechende Resistenzentwicklungsversuche in-vivo bekräftigt werden, da weder pharmakokinetische Faktoren berücksichtigt wurden, noch der Einfluss des Immunsystems auf die Keimabtötung abgeschätzt werden kann. Nichtsdestotrotz lassen die von Dalhoff aufgezeigten Parallelen seiner In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen vermuten, dass die in-vitro gewonnenen Erkenntnisse auch wichtige Anhaltspunkte für den klinischen Einsatz der unterschiedlichen Fluorchinolone darstellen [126].

Da die Chinolon-Resistenzen aufgrund des gesteigerten Verbrauchs dieser Wirkstoffe weltweit zunehmen, ist diese Arbeit auch der Frage nach wirksamen Antibiotika zur Behandlung

Chinolon-resistenter *S. pneumoniae* Stämme nachgegangen. Zu diesem Zwecke wurden die MHK-Werte 25 klinischer *S. pneumoniae* Isolate mit erniedrigter Levofloxacin-Sensibilität (MHK  $\geq 2$  mg/l) gegenüber Faropenem, einem neuen, zur oralen Anwendung bestimmten Penem und Penicillin als  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Leitsubstanz im Vergleich ermittelt. Alle Isolate erwiesen sich als Faropenem-sensibel mit minimalen Hemmkonzentrationen zwischen 0,008 und maximal 0,5 mg/l. Faropenem war außerdem dem Penicillin überlegen. Somit könnte das Faropenem eine gute Behandlungsmöglichkeit Chinolon-resistenter Pneumokokken darstellen, wenn die In-vitro-Resultate sich auch in-vivo bestätigen ließen.

Die dringende Notwendigkeit der Weiterentwicklung verbesserter  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wird nur allzu deutlich, wenn man sich die hohe weltweite Rate an Penicillin-Resistenz von 21,8% (im Jahre 2003) anschaut [123]. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass das neue Breit-spektrum- $\beta$ -Laktam Faropenem eine gute In-vitro-Aktivität gegenüber Erregern von Atemwegsinfekten, ebenso wie gegenüber Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonellen*, *Klebsiellen*, *Enterobacter species.*, *Proteus*, *Yersinien*) und Anaerobiern aufweist [105, 106; 124]. Unter anderem konnten Boswell et al. zeigen, dass Faropenem eine signifikante bakterizide Wirksamkeit und einen guten post-antibiotischen Effekt gegenüber *S. pneumoniae*-Isolaten aufweist [105]. Auch Schmitz et al demonstrierten eine gute Wirksamkeit des neuen Penems gegenüber einer signifikanten Anzahl von insgesamt 1191 europäischen klinischen *S. pneumoniae* Stämmen mit einem maximalen MHK von 0,5 mg/l, also unter dem angenommenen klinischen Grenzwert von 1mg/l, sogar wenn verminderte Penicillin-Empfindlichkeit vorlag [125].

Die neueste Studie zur Bewertung der Faropenem-Wirkung auf pathogene Keime des respiratorischen Traktes untersuchte ein großes Kollektiv von insgesamt 1543 *S. pneumoniae* Isolaten aus den USA. Critchley et al. konnten dabei zunächst eine mittlere Penicillin-Resistenz-Rate von 16% nachweisen, wobei die einzelnen Quoten Regions-abhängig schwankten und in einem Bereich von 8,7 bis 22,5% lagen. Die Rate der  $\beta$ -Laktam-Resistenz war höher unter den *S. pneumoniae* Isolaten von Kindern als unter denjenigen von Erwachsenen [127], vermutlich weil die  $\beta$ -Laktame gehäuft zur Behandlung von Atemwegsinfekten bei Kindern zum Einsatz kommen, im Gegensatz zu den Chinolonen, deren höchste Resistenz-Rate bei Isolaten von älteren Patienten vorliegt (s. oben, [113]). Die MHK<sub>90</sub> für Faropenem betrug für die getesteten Pneumokokken 0,5 mg/l [127] und entspricht somit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen, oben näher aufgeführten Ergebnissen.

Piddock et al zeigten ebenfalls, dass Faropenem hervorragende Wirksamkeit gegenüber Ciprofloxacin-resistenten Keimen besitzt und keinerlei Beziehung zwischen Ciprofloxacin- und Faropenem-Resistenz besteht, unabhängig vom Ausmaß der Ciprofloxacin-Resistenz [124].

Faropenem scheint somit ein viel versprechendes neues Antibiotikum zu sein und bedarf weiterer klinischer Forschung, vor allem im Hinblick auf den Einsatz als Anti-Pneumokokken-Mittel und als alternative Behandlungsmöglichkeit Antibiotika-resistenter Keime.

Im Falle der zwar aktuell noch seltenen, aber zunehmenden Levofloxacin-unempfindlichen *S. pneumoniae* Stämme (1,4% im Jahre 2003) konnten Jones et al. zeigen, dass außerdem die ebenfalls zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gehörenden parenteralen Cephalosporine Ceftriaxon (dritte Generation) und Cefepim (vierte Generation) eine gute Behandlungsoption für hospitalisierte Patienten mit ambulant erworbenen Pneumonien darstellen [122].

Um einen Eindruck der Resistenz gegenüber anderen Erregern von Atemwegsinfektionen zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit die MHK klinischer *Moraxella catarrhalis* Isolate gegenüber Faropenem und der Vergleichssubstanz Penicillin bestimmt, sowie gegenüber den Chinolonen Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin, nachdem zuvor die genetische Charakterisierung der vorkommenden BRO  $\beta$ -Laktamasen der Isolate erfolgt war.

*Moraxella catarrhalis* galt lange Zeit als harmloses Kommensal des Respirationstraktes, mittlerweile ist jedoch bekannt, dass der Keim die dritthäufigste Ursache von Infektionen der oberen unteren Atemwege darstellt, wobei Kinder und COPD-Patienten am anfälligsten sind [90]. Die Prävalenz an  $\beta$ -Laktamase-produzierenden *Moraxella catarrhalis* Stämmen stieg während der letzten zwei Jahrzehnte kontinuierlich an, nachdem sie 1977 erstmalig nachgewiesen worden war, und heute produzieren mehr als 90% der klinischen Isolate diese Enzyme [90, 95, 148]. Studien belegten des Weiteren, dass 90 –95% der  $\beta$ -Laktamase-produzierenden Stämme das BRO-1 Enzym bilden, während weniger als 10% das BRO-2 Enzym produzieren [65, 66]. Die weltweite Rate an  $\beta$ -Laktamase-Produzenten ist in den letzten Jahren mit ca. 90 - 95,6% konstant hoch geblieben. Critchley et al. konnten z. B. unter den 489 *M. catarrhalis* Stämmen, die 2005 bis 2006 in den USA im Rahmen von ambulant erworbenen Infektionen des respiratorischen Traktes isoliert worden waren, 91,6%  $\beta$ -Laktamase-Produzenten identifizieren [55, 90, 127, 139, 140, 143]. Wenn wir diese Resultate berücksichtigen, legen die damit konform gehenden Ergebnisse dieser Arbeit die Schlussfolgerung nahe, dass die Rate der  $\beta$ -Laktamase-Produktion und das Verhältnis der Stämme, die BRO-1 bzw. BRO-2 produzieren, in den letzten 10 Jahren annähernd konstant geblieben ist [65, 66, 127, 140, 143].

Die BRO-1 produzierenden Stämme wiesen für Penicillin und Faropenem deutlich höhere MHK-Werte auf als die BRO-2-Stämme, so dass von einer verstärkten Resistenz dieser Stämme auszugehen ist. Auch in früheren Arbeiten wie der von Richter et al. wurde die allgemeine Tendenz einer höheren  $\beta$ -Laktam-Resistenz bei den BRO-1-Produzenten deutlich [149]. Diese Resistenz scheint hauptsächlich durch die bereits bekannte 21 bp Deletion verursacht zu werden, die offenbar den wichtigsten Unterschied in der regulatorischen Region der beiden Gene darstellt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere mögliche Promotorsequenzen in den BRO Genen existieren und dass Alterationen in diesen Sequenzen zu MHK-Unterschieden führen. Auch Richter et al. vermuteten aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Ampicillin-MHK-Werte für BRO-1 Stämme, dass es noch andere Faktoren außer des Enzym-Typs geben müsse, die die Antibiotika-Empfindlichkeit beeinflussen [149].

Faropenem zeigte eine gute, im Vergleich zu Penicillin sogar die bessere Wirksamkeit, ohne Hinweise für Resistenzen bei maximalen MHK-Werten von 1 mg/l. Die hohe Wirksamkeit von Faropenem gegenüber Erregern von Atemwegsinfekten wurde auch von Critchley et al anhand eines großen Bakterien-Kollektivs nachgewiesen [55].

Alle getesteten Chinolone zeigten ebenfalls eine gute in-vitro-Aktivität ohne Hinweise für Resistenzen bei maximalen MHK-Werten von 1 mg/l. Am wirksamsten war Gatifloxacin mit einem maximalen MHK von 0,25 mg/l. Was die Chinolone angeht, verursachte die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein von  $\beta$ -Laktamase, egal welchen Typs, keinen signifikanten Unterschied in der antibiotischen Wirksamkeit. Diese Ergebnisse, die maximale MHK-Werte von 1 mg/l für alle getesteten Chinolone nachwiesen sind vergleichbar mit denen anderer Studien [140, 143, 150]. Sehr seltene Chinolon-resistente Isolate wurden jedoch 1998 im Rahmen der US SENTRY Studie beschrieben [151]. Allgemein haben sich die MHK-Werte von *Moraxella catarrhalis* für die verschiedenen Substanzen in den letzten Jahren nur wenig verändert. Trotzdem ist eine anhaltende Surveillance nötig, um etwaige Resistenz-Zunahmen frühzeitig zu registrieren [143, 148].

Diese Arbeit hat sich mit der Frage beschäftigt, ob das Gruppe-IV-Fluorchinolon Gatifloxacin und das neue oral anwendbare Faropenem, aus der Klasse der Peneme, tatsächlich wirksamere Alternativen zur Therapie von Atemwegsinfektionen darstellen. Bezüglich der Resistenzentwicklung wurde untersucht, ob diese bei Gatifloxacin, als C8-Methoxy-Chinolon, tatsächlich langsamer abläuft.

Zwar konnte die vorliegende Arbeit sowohl eine sehr gute Wirksamkeit der zwei untersuchten Antibiotika gegenüber den Erregern von Atemwegsinfektionen, als auch eine langsamere Re-



sistenzentwicklung der Pneumokokken gegenüber Gatifloxacin nachweisen, was von aktuellen Studien untermauert wird, dennoch stehen beide Mittel aktuell nicht zwecks klinischer Anwendung zur Verfügung.

Das zur 4. Generation der Gyrasehemmer gehörende Gatifloxacin war in den USA und Kanada zunächst seit 1999 unter dem Handelsnamen Tequin® (Firma Bristol-Myers Squibb), in Deutschland seit Anfang November 2001 unter dem Handelsnamen Bonoq® (Firma Grünenthal) zugelassen. Bristol-Myers Squibb hatte ursprünglich die Rechte von dem japanischen Pharmaunternehmen Kyorin Pharmaceutical Company of Japan übernommen [130-132]. Gatifloxacin wurde mit Beginn des Jahres 2004 in Deutschland von der verantwortlichen pharmazeutischen Firma wieder aus dem Handel genommen, u. zw. weil die europäischen Zulassungsbehörden die damals vereinzelt aufgetretenen hypo- und hyperglykämischen Unverträglichkeitsreaktionen zum Anlass nahmen, die Indikationen auf ambulant erworbene Pneumonie und komplizierte Harnwegsinfektionen zu reduzieren, nachdem das Mittel initial in Deutschland für ein relativ breites Indikationsspektrum zugelassen worden war [128]. Nach der Veröffentlichung einer groß (1,4 Millionen Krankenakten) angelegten kanadischen Fall-Kontroll-Studie Ende März 2006, wonach die Behandlung älterer Patienten ( $\geq 66$  Jahre) mit Gatifloxacin ein erhöhtes Risiko für Hypoglykämien und ein erheblich erhöhtes Risiko für Hyperglykämien mit sich bringe, und zwar unabhängig davon, ob ein Diabetes mellitus zuvor bekannt war oder nicht [129], wurde das Mittel in seiner oralen und parenteralen Darreichungsform im Mai 2006 vom US-Markt genommen [132]. In den Vereinigten Staaten ist Gatifloxacin zur Zeit nur noch in Form von Augentropfen (Zymar®) erhältlich.

Das erste oral wirksame Penem Faropenem wurde von Daiichi Asubio Pharma entwickelt und wird von dem Unternehmen in zwei Formen vertrieben: 1. das Natrium-Salz „faropenem sodium“, welches seit 1997 in Japan unter dem Handelsnamen Farom vertrieben wird und 2. das „prodrug“ „faropenem medoxomil“ oder „faropenem daloxate“. Das amerikanische Pharmaunternehmen Replidyne hat die Lizenz für Faropenem-Medoxomil von Daiichi Asubio Pharma übernommen und plant die Vermarktung zusammen mit Forest Pharmaceuticals. Laut Replidyne befindet sich Faropenem zur Zeit in der späten Phase der klinischen Entwicklung zur Behandlung von Erwachsenen mit akuter bakterieller Sinusitis, akuter Exacerbation einer chronischen Bronchitis und ambulant erworbener Pneumonie. Das Mittel soll außerdem Phase II der klinischen Erprobung der Behandlung von akuter Mittelohrentzündung bei Kindern abgeschlossen haben [133-135]. Laut Schurek et al wurde die Zulassung des Medikamentes auf den US-Markt Ende 2006 von der zuständigen Behörde, der FDA (Food and Drug Admi-

nistration) abgelehnt, angeblich da die durchgeführten klinischen Erprobungen nicht aussagekräftig genug gewesen und daher weitere Studien und klinische Versuche notwendig seien [136].

Zusammenfassend bekräftigen die Resultate dieser Arbeit einmal mehr, wie wichtig es ist, die klassischen Antibiotika sinnvoll und sparsam einzusetzen, anstatt verschwenderisch damit umzugehen, in der Vorstellung, man könne sich auf die Entwicklung neuer, potenterer Wirkstoffe verlassen. Denn die neuen Wirkstoffe lassen sich bezüglich ihrer Resistenzentwicklung und vor allem bezüglich etwaiger schwerer Nebenwirkungen, die erst im Verlauf der breiten Anwendung erkannt werden können, nicht ausreichend einschätzen. Das Beispiel des Gatifloxacin mit der zunächst langsameren Resistenzentwicklung zeigt, dass sich auch gegenüber dieses potenten Wirkstoffs nach einer ausreichend langen Zeit sehr wohl Resistenzen entwickeln und dass die entstandenen Mutanten auch noch Kreuzresistenzen gegenüber anderen Chinolonen besitzen. Natürlich lassen sich die Ergebnisse der hier in-vitro durchgeführten Untersuchungen nicht ohne weiteres auf die In-vivo-Situation übertragen, jedoch gibt es Hinweise für einen ähnlichen In-vivo-Verlauf. Daher sollte unbedingt von einer unbedenklichen breiten Anwendung der Chinolone Abstand genommen werden, um die Resistenzentwicklung nicht weiter zu forcieren.

## 5. Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* zählen zu den häufigsten Erregern von Atemwegserkrankungen, die auch heute noch tödlich enden können. Zurzeit zeigen beide Keime Resistenzen gegenüber den traditionell angewendeten Antibiotika. Vor allem die zunehmende Resistenz der Pneumokokken gegenüber Penicillin und die häufig damit assoziierte Multiresistenz gegenüber mehreren Wirkstoffklassen sind besorgniserregend. Aufgrund dieser Resistenzen hat die Anwendung alternativer Antibiotikaklassen, z. B. der Chinolone, erheblich zugenommen. Das hatte wiederum einen deutlichen Anstieg der Resistenzrate gegenüber diesen Wirkstoffen zur Folge, auch wenn die Werte aktuell noch relativ gering sind. In der vorliegenden Arbeit wurden klinische *Streptococcus pneumoniae* Isolate aus Europa bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem neueren C8-Methoxy-Fluorchinolon Gatifloxacin verglichen mit Ciprofloxacin als Leitsubstanz und Levofloxacin als Standardtherapeutikum bei der Behandlung von Pneumokokken-Infektionen untersucht. Gatifloxacin zeigte die höchste in-vitro Wirksamkeit, wie für die C8-Methoxy-Fluorchinolone vermutet. Durch in-vitro Selektionsversuche sollte ermittelt werden, ob und wie schnell eine Resistenzentwicklung der Pneumokokken gegenüber Gatifloxacin erfolgt. Diese zeigten, dass gegenüber allen Chinolonen eine Resistenzentwicklung mit Selektion klinisch resistenter Isolate eintrat, allerdings unterschiedlich schnell. Die Resistenzentwicklung der *Streptococcus pneumoniae* Isolate verlief gegenüber Gatifloxacin etwas langsamer, sie trat aber dennoch auf. Um die Gründe für die Entstehung von Resistenzen näher zu untersuchen wurden die resistenten Stämme sequenziert. Dabei fanden sich die klassischen Mutationen in den gyrA- und parC-Genen der Chinolon-Zielstrukturen Gyrase und Topoisomerase IV, wobei die parC-Alterationen deutlich überwogen, was dafür spricht, dass die Topoisomerase IV das primäre Target von Gatifloxacin ist. Um mögliche Alternativtherapien im Falle von Chinolon-Resistenz zu bewerten, wurde die Wirksamkeit des Faropenems, eines neuartigen, zur oralen Anwendung bestimmten Penems, gegenüber klinischer Levofloxacin-unempfindlicher *Streptococcus pneumoniae* Isolate untersucht, verglichen mit Penicillin als Leitsubstanz der  $\beta$ -Laktame. Alle untersuchten Isolate erwiesen sich als Faropenem-sensibel, so dass dieser Wirkstoff als hoffnungsvolle Therapieoption zur Behandlung Chinolon-resistenter Pneumokokken angesehen werden kann. Um einen Eindruck von der Empfindlichkeit weiterer Erreger von Atemwegsinfektionen gegenüber den getesteten Antibiotika zu erhalten, wurden die Experimente zur Empfindlichkeits-Bestimmung anhand klinischer *Moraxella catarrhalis* Isolate wiederholt. Sowohl die Chinolone als auch Faropenem zeigten gute

Wirksamkeit ohne Hinweise für Resistenzen. Die Sequenzierung der Gene ergab eine Rate an  $\beta$ -Laktamase-Produzenten von 92,2%. Davon waren 94,5% BRO-1- und lediglich 5,5% BRO-2-Stämme. Die BRO-1 produzierenden Stämme wiesen für Penicillin und Faropenem deutlich höhere MHK-Werte auf als die BRO-2-Stämme, so dass von einer verstärkten Resistenz dieser Stämme auszugehen ist. Diese Resistenz scheint hauptsächlich durch die bereits bekannte 21 bp Deletion verursacht zu werden. Zusammenfassend belegen die vorliegenden Ergebnisse zwar die gute Wirksamkeit von Faropenem und Gatifloxacin gegenüber den Erregern von Infektionen des respiratorischen Traktes, trotzdem muss betont werden, dass es wichtig ist, die klassischen Antibiotika sinnvoll und sparsam einzusetzen, anstatt verschwenderisch damit umzugehen, in der Vorstellung, man könne sich auf die Entwicklung neuer, potenterer Wirkstoffe verlassen. Denn die neuen Wirkstoffe lassen sich bezüglich ihrer Resistenzentwicklung und vor allem bezüglich etwaiger schwerer Nebenwirkungen, die erst im Verlauf der breiten Anwendung erkannt werden können, nicht ausreichend einschätzen. Das Beispiel des Gatifloxacins zeigt, dass sich auch gegenüber dieses potenten Wirkstoffs nach einer ausreichend langen Zeit sehr wohl Resistenzen entwickeln. Daher sollte unbedingt von einer unbedenklichen breiten Anwendung der Chinolone Abstand genommen werden, um die Resistenzentwicklung nicht weiter zu forcieren. Weiterhin ist anhaltende Surveillance wichtig, um etwaige Resistenz-Zunahmen frühzeitig zu registrieren.

## 6. Literatur

1. Wilkens, H., Sybrecht, G. W.: Kapitel 7.5 - Erregerbedingte Erkrankungen des Respirationstrakts, Thiemes Innere Medizin: TIM. Thieme Verlag. (1999).
2. Whitney CG, Farelly MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, Lefkowitz L, Cieslak PR, Cetron M, Zell ER, Jorgensen JH, Schuchat A, Facklam RR, Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. N. Engl. J. Med. (2000); 343: 1917-1924.
3. Blondeau JM, Laskowski R, Bjarnason J, Steward C. Comparative in vitro activity of Gatifloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin and Trovafloxacin against 4151 gram-negative and gram-positive organisms. Int. J. Antimicrob. Agents (2000); 14: 45-50.
4. Dalhoff A, Petersen U, Endermann R. In vitro activity of BAY 12-8039, a new 8-methoxyquinolone. Chemotherapie (1996), 42: 410-425.
5. Davies TA, Kelly LM, Pankuch GA, Credito KL, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antipneumococcal activities of Gemifloxacin compared to those of nine other agents. Antimicrob. Agents Chemother. (2000); 44: 304-310.
6. Jorgensen JH, Weigel LM, Ferraro MJ, Swenson JM, Tenover FC. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* loci. Antimicrob. Agents Chemother. (1999); 43: 329-334.
7. Milatovic D, Schmitz FJ, Brisse S, Verhoef J, Fluit AC. In vitro activities of Sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8796 clinical bacterial isolates. Antimicrob. Agents Chemother. (2000); 44: 1102-1107.
8. Kayser, F. H.: Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, 9. Auflage (1998).
9. Estler: Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer Verlag, 5. Auflage (1999).
10. Heisig P: Fluorchinolonecarbonsäuren. Arzneimitteltherapie (1997) Jahrgang 15; Heft 1: 14-22.
11. Heisig P: Fluorchinolonecarbonsäuren. Arzneimitteltherapie (1997) Jahrgang 15; Heft 1: 14-22.
12. Fung-Tomc JC, Minassian B, Kolek B, Huczko E, Aleksunes L, Stickle T, et al: Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. Antimicrob. Agents Chemother.(2000) 44: 3351-56.

13. Chen CR, Malik M, Snyder M, Drlica K: DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial Chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* (1996); 258: 627-637.
14. Drlica, K, Zhao, X: DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (1997) 61: 377-392.
15. Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon J, Blanche F: Cloning and primary structure of *S. aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Molecular Microbiology.* (1994) 13: 641-653.
16. Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozarelli NR: Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:11801-11805.
17. Khodursky AB, Cozarelli N: The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Bio. Chem.* (1998) 273: 27668-27677.
18. Munoz R, de la Campa AG: *ParC* subunit of DNA topoisomerase IV of *S. pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2252-2257.
19. Perichon BJ, Tancoviv J, Courvalin P: Charakterization of a mutation in the *parE* gene that fluoroquinolone resistance in *S. pneumoniae* . *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41: 1166-1167.
20. Wiedemann B, Heisig P: Mechanisms of quinolone resistance. *Infection* (1994) 22 (Suppl 2): S73-79.
21. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA: DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1976) 73: 3872-3876.
22. Gellert M, Menzel R, Mizuuchi D, Nash H: Regulation of DNA supercoiling in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1983) 47: 763-767.
23. Reece R, Maxwell A: DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (1991) 26: 335-375.
24. Peng H, Mariani K: The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.* (1995) 270: 25286-25290.
25. Peng H, Mariani K: *Escherichia coli* topoisomerase IV: purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* (1993) 268: 24482-24490.
26. Zechiedrich EL, Cozarelli N: Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* (1995) 9: 2859-2869.

27. Zechiedrich EL, Khodursky A, Cozarelli N: Topoisomerase IV, not gyrase decatenates products of site-specific recombination in *E. coli*. *Genes & Development* (1997) 11: 2580-2592.
28. Kampranis SC, Maxwell A: The DNA gyrase-quinolone complex, ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* (1998) 173: 22615-22626.
29. Shreedhan S, Oram M, Jensen B, Peterson LR, Fisher LM: DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarities with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (1990) 172: 7260-7262.
30. Hiasa H, Yousefs D, Marians KJ: DNA strand cleavage is required for replikation fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone ternary complex. *Journal of Biological Chemistry* (1996) Vol. 271, No 42: 26424-26429.
31. Philips I, Culebras E, Moreno F, Baquero: Induction of the SOS-response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* (1987) 20a: 631-638.
32. Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999); 43:1756-1758.
33. Dong, Y, Zhao X, Kreiswirth BN, Drlica K. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:2581-2584.
34. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol.* (1999); 2:504-508.
35. Lu T, Zhao X, Drlica K. Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999); 43:2969-2974.
36. Lu T, Zhao X, Li X, Drlica-Wagner A, Wang JY, Domagala J, Drlica K: Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (2001) 45: 2703-2709.
37. Zeller V, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L, Moreau NJ: Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41: 1973-1978.
38. Zhao X, Wang JY, Xu C, Dong Y, Zhou J, Domagala J, Drlica K. Killing of *Staphylococcus aureus* by C-8-methoxy fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998); 42:956-958.

39. Davies TA, Pankuch GA, Dewasse BE, Jacobs MR, Appelbaum P: In vitro development of resistance to five quinolones and amoxicillin-clavunate in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1999) 43:1177-1182.
40. Vogel F, Scholz H: Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Erwachsenen. *Chemother J.* (2002) 11:47-58.
41. Vogel F, Bodmann KF, et al.: Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemother J.* (2004) 13:46-105.
42. Fournier B, Hooper DC: Effects of mutations in *grrA* of topoisomerase VI of *Staphylococcus aureus* on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998) 42: 2109-2112.
43. Fukuda H, Hiramatsu K: Primary targets of fluoroquinolones in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 410-412.
44. Gootz TD, Zaniewski R, Haskell S, Schmieder B, Tancovic J, Girard D, Courvalin P, Polzer RJ: Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin against DNA gyrase and topoisomerase IV mutants of *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2691-2697.
45. Gootz TD, Zaniewski, R, Haskell SL, Kaczmarek, FS and Maurice AE: Activities of trovafloxacin compared with those of other fluoroquinolones against purified topoisomerases and *gyrA* and *grrA* mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 1845-1855.
46. Gonzalez I, Georgiou M, Alcaide F, Balas D, Linares J, de la Campa A: Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998) 42: 2792-2798.
47. Heisig P: Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high level fluoroquinolone resistance in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 879-885.
48. Sader HS, Gales AC: Emerging Strategies in Infectious Diseases. New Carbapenem and Trinem Antibacterial Agents. *Drugs* (2001) 61(5): 553-564.
49. Janoir C, Zeller V, Kitzis MD, Moreau NJ, Gutmann L: High-level fluoroquinolone resistance in *S. pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1996) 40: 2760-2764.
50. Janoir C, Varon E, Kitzis MD, Gutmann L: New mutation in *parE* in a pneumococcal in vitro mutant resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001) 45: 952-955.



51. Jones ME, Sahm DF, Martin N, Scheuring S, Heisig P, Thornsberry C, Köhrer K, Schmitz FJ: The Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* mutations in clinical isolates *S. pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (2000) 44: 462-466.
52. Kaneko A, Sasaki J, Shimadzu M, Kanamaya A, Saiki T, Kobayashi I: Comparison of *gyrA* and *parC* mutations and resistance levels among fluoroquinolone-resistant isolates and laboratory-derived mutants of oral streptococci. *J. Antimicrob. Chemother.* (2000) 45: 771-775.
53. Kanematsu E, Deguchi T, Yasude M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y: Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *E. faecalis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1998) 42: 433- 435.
54. Munoz Bellido JL, Alonzo Manzanares MA, Yague Guirao G, Gutierrez Zufiaurre MN, Toldos MC, Segovia Hernandez M, Garcia-Rodriguez JA: In vitro activities of 13 fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* isolates with characterized mutations in *gyrA*, *gyrB*, *griA* and *norA* and against wild-type isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*(1997) 43: 966-968.
55. Critchely IA, Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Murfitt K, Sahm DF: Activities of Faropenem, an Oral  $\beta$ -Lactam, against Recent U.S. Isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* (2002) 46: 550-555.
56. Ng EY, Trucksis M, Hooper DC: Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *S. aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (1996) 40: 1881-1888.
57. Pan XS, Ambler J., Mehtar S, Fisher LM: Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2321-2326.
58. Pan XS, Fisher LM: Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *S. pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J. Bacteriol.* (1996) 178 (14): 4060-4069.

59. Pan XS, Fisher LM: Targeting of DNA gyrase by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41: 471-474.
60. Pan XS, Fisher LM: DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998) 42: 2810-2816.
61. Pestova E, Beyer R, Cianciotto NP, Noskin GA, Peterson LR: Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 2000-2004.
62. Hagenbeck, R: Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae*. Evolution und Verbreitung. *Chemother. J.* (1998) 7:43-49.
63. Enright MC, McKenzie H. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* - clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J. Med. Microbiol.* (1997); 46:360-371.
64. Taba H, Kusano N: Sparfloxacin resistance in clinical isolates of *S. pneumoniae*: involvement of multiple mutations in *gyrA* and *parC* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998) 42: 2193-2196.
65. Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect.* 2000; 2:547-559.
66. McGregor K, Chang BJ, Mee BJ, Riley TV. *Moraxella catarrhalis*: clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (1998); 17:219-234.
67. Tankovic JB, Perichon B, Duval D, Couvalin P: Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *S. pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2505-2510.
68. Tankovic JF, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclero R: Development of fluoroquinolone resistance in *E. faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40: 2558-2561.
69. Walker ES, Preston RA, Post JC, Ehrlich GD, Kalbfleisch JH, Klingman KL. Genetic diversity among strains of *Moraxella catarrhalis*: analysis using multiple DNA probes and a single-locus PCR-restriction fragment length polymorphism method. *J. Clin. Microbiol.* (1998); 36:1977-1983.
70. Ince D, Hooper DC: Mechanisms and frequency of resistance to premafloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44: 3344-3350.

71. Ince D, Hooper DC: Mechanisms and frequency of resistance to gatifloxacin in comparison to AM-1121 and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001) 45: 2755-2764.
72. Phillipon A, Riou JY, Guibourdenche M, Sotolongo F. Detection, distribution and inhibition of *Branhamella catarrhalis*  $\beta$ -lactamase. *Drugs* 1986; 31, suppl. 3: 64-69.
73. Stewart BA, Johnson AP, Woodford N: Relationship between mutations in *parC* and *gyrA* of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and resistance to ciprofloxacin and grepafloxacin. *J. Med. Microbiol.* (1999) 48: 1103-1106 .
74. Guerin F, Varon E, Buu Hoi A, Gutmann L, Podglajen I: Fluoroquinolone resistance associated with target mutations and active efflux in oropharyngeal colonizing isolates of viridans streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44: 2197-2200.
75. Yan SS, Fox ML, Holland AM, Stock F, Gill VJ, Fedorko DP: Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification for *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44: 3196-3198.
76. Willmot CJ, Maxwell A: A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase DNA complex . *Antimicrob. Agents Chemother.* (1993) 37: 126-127.
77. Fukuda H, Kishii R, Hosaka M: Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001): 45: 1649-1653.
78. Heaton VJ, Goldsmith CE, Ambler JE, Fisher LM: Activity of gemifloxacin against penicillin- and ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* displaying topoisomerase- and efflux-mediated resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 2998-3000.
79. Heaton VJ, Ambler JE, Fisher LM: Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, an in vitro target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavable complexes in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44: 3112-3117.
80. Wallace RJ Jr, Nash DR, Steingrube VA. Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Am. J. Med.* (1990); 88:46-50.
81. Varon E, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L: *ParC* and *GyrA* may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *S. pneumoniae* . *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 302-306.

82. Fernandez-Moreira E, Balas D, Gonzalez I, de la Campa AG: Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase IV than DNA gyrase native proteins. *Microb. Drug Resist.* (2000) 6: 259-67.
83. Pan XS, Fisher LM: *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 1129-1136.
84. Bedenic B, Zagar Z. Increased beta-lactamase activity in *Branhamella catarrhalis* after exposure to amoxicillin and clavulanic acid. *J. Chemother.* (1994); 6:383-387.
85. Hoi-Dang AB, Brive-Le Bouguenec C, Barthelemy M, Labia R. Novel beta-lactamase from *Branhamella catarrhalis*. *Ann. Microbiol. (Paris)*. (1978); 129B:397-406.
86. Labia R, Barthelemy M, Le Bouguennec CB, Buu Hoi-Dang Van A. Classification of beta-lactamases from *Branhamella catarrhalis* in relation to penicillinases produced by other bacterial species. *Drugs*. (1986); 31(Suppl 3):40-47.
87. Bootsma HJ, Aerts PC, Posthuma G, Harmsen T, Verhoef J, Van Dijk H, Mooi FR. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* BRO beta-lactamase: a lipoprotein of gram-positive origin? *J. Bacteriol.* (1999); 181:5090-5093.
88. Bootsma HJ, Van der Heide HG, Van de Pas S, Schouls LM, Mooi FR. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits. *J. Infect. Dis.* (2000); 181:1376-1387.
89. Bootsma H J, Van Dijk H, Vauterin P, Verhoef J, Mooi FR. Genesis of BRO beta-lactamase-producing *Moraxella catarrhalis*: evidence for transformation-mediated horizontal transfer. *Mol. Microbiol.* (2000); 36:93-104.
90. Bootsma HJ, Van Dijk H, Verhoef J, Fleer A, Mooi FR. Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996); 40:966-972.
91. Buu Hoi-Dang Van A, Brive-Le Bouquence B, Barthelemy M, Labia R. Novel  $\beta$ -lactamases from *Branhamella catarrhalis*. *Annals of Microbiology* (1978); 128B :6-10.
92. Farmer T, Reading C.  $\beta$ -lactamases of *Branhamella catarrhalis* and their inhibition by clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1982); 21:506-508.
93. Gill MJ, Brenwald, NP, Wise R: Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *S. pneumoniae* . *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43: 187-1189.
94. Simpson IN, Plested SJ. The origin and properties of  $\beta$ -lactamase satellite bands seen in isoelectric focusing. *J Antimicrob. Chemother.* (1983); 12: 127-131.

95. Fung CP, Yeo SF, Livermore DM. Susceptibility of *Moraxella catarrhalis* isolates to beta-lactam antibiotics in relation to beta-lactamase pattern. *J. Antimicrob. Chemother.* (1994); 33:215-222.
96. Kallings I, Bengtsson S, Christensen P, Holm SE, Lind L, Kalin M. Antibiotic sensitivity of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Branhamella catarrhalis* isolated from upper respiratory tract infections in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious diseases* (1983); suppl. 39: 100-105.
97. Wallace RJ Jr., Steingrube VA, Nash D R, Hollis DG, Flanagan C, Brown BA, Labidi A, Weaver RE. BRO beta-lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal beta-lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens*, and *M. lacunata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1989); 33:1845-1854.
98. Calbo E, Garau J: Application of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics to Antimicrobial Therapy of Community-Acquired Respiratory Tract Infections. *Respiration* (2005); 72:561-571.
99. Witte W: Fluorchinolone mit verbesserter Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien - vergleichende Erörterung der in-vitro Daten. *Der Mikrobiologe* (1998) 5. Jahrgang; Heft 5: 169-172.
100. Broskey J, Coleman K, Gwynn MN, McCloskey L, Traini C, Voelker L, Warren R: Efflux and target mutations as quinolone resistance mechanisms in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* (2000) 45: (suppl 1) 95-99.
101. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayesky J, Bell J, Jones RN, Beach M: Survey of infections due to Staphylococcus species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Inf. Dis.* (2001) 32 (Suppl.2): S114-133.
102. Hoban DJ, Doern GC, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN: Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Inf. Dis.* (2001) 32 (Suppl.2): S81-84. 1
103. Rosin H, Henschler D (1996) Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

104. Mitsuhashi S, Franceschi G: Penem Antibiotics. Japan Scientific Societies Press, (1991). Springer-Verlag.
105. Boswell FJ, Andrews JM, Wise R: Pharmacodynamic properties of faropenem demonstrated by studies of time-kill kinetics and postantibiotic effect. *J. Antimicrob. Chemother.* (1997) 39:415-418.
106. Woodcock JM, Andrews JM, Brenwald NP, Ashby JP, Wise R: The in-vitro activity of faropenem, a novel oral penem. *J. Antimicrob. Chemother.* (1997) 39:35-43.
107. Marchese A, Debbia E, Bryskier A, Schito GC: Antimicrobial activity of faropenem, a novel oral penem, against lower respiratory tract pathogens. *Clinic. Microbiol. and Infect.* (1999) 5:282-287.
108. Karow T, Lang R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage (2000).
109. Hol C, Schalen C, Verduin C M, Van Dijke EE, Verhoef J, Fleer A, Van Dijk H. *Moraxella catarrhalis* in acute laryngitis: infection or colonization? *J. Infect. Dis.* (1996); 174:636-638.
110. Hol C, Van Dijke EE, Verduin CM, Verhoef J, Van Dijk H. Experimental evidence for *Moraxella*-induced penicillin neutralization in pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* (1994); 170:1613-1616.
111. Hol C, Verduin CM, Van Dijke EE, Verhoef J, Van Dijk H. Complement resistance in *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*. *Lancet.* (1993); 341:1281.
112. Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*, p.324-340. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover, (ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (1995), 6th ed. ASM Press, Washington, D.C.
113. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, Hoban DJ, Zhanel GG: Molecular Characterization of Increasing Fluorquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007); 51(1):198-207.
114. LaPlante KL, Rybak MJ, Tsuji B, Lodise TP, Kaatz GW: Fluorquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Area Under the Concentration-Time Curve/MIC Ratio and Resistance Development with Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007); 51(4):1315-1320.
115. Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum A: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2005); 49:2903-2913.

116. Castanheira M, Gales AC, Pignatari AC, Jones RN, Sader HS: Changing antimicrobial susceptibility patterns among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Microb. Drug. Resist.* (2006); 12(2):91-8.
117. Schmitz FJ, Boos M, Mayer S, Hafner D, Jagusch H, Verhoef J, Fluit AC: Propensity of fluoroquinolones with different moieties at position 8 to cause resistance development in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001); 45:2666-2667.
118. De Azavedo JC, Duncan CL, Kilburn L, Downar J, Kong B, Lad S, Low DE, Bast DJ: Relative potential for selection of quinolone-resistance-determining-region mutations in *Streptococcus pneumoniae* by gemifloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin. *J. Chemother.* (2006); 18(4):373-8.
119. Schmitz FJ, Fischer A, Boos M, Mayer S, Milatovic D, Fluit AC: Quinolone-resistance mechanisms and in-vitro susceptibility patterns among European isolates of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2001); 20:219-222.
120. Cantón R, Unal S, Farrell DJ: Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1-5 (1999-2004). *International Journal of Antimicrobial Agents.* (2007); 30(6):546-550.
121. Jones RN, Rubino CM, Bhavnani SM, Ambrose PG: Worldwide antimicrobial susceptibility patterns and pharmacodynamic comparisons of gatifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*: Report from the Antimicrobial Resistance Rate Epidemiology Study Team (ARREST). *Antimicrob. Agents Chemother.* (2003); 47(1):292-296.
122. Jones RN, Fritsche TR, Sader HS: Therapeutic options among broad-spectrum beta-lactams for infections caused by levofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2005); 52(2):129-33.
123. Schito GC, Felmingham D: Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, azithromycin and telithromycin (PROTEKT 1999-2003). *International Journal of Antimicrobial Agents.* (2005); 26(6):479-485.
124. Piddock LJV, Johnson MM, Webber MA: Activity of faropenem and imipenem for ciprofloxacin-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* (2003); 52:500-502.

125. Schmitz FJ, Verhoef J, Miltovic D, Fluit AC: Treatment options for *Streptococcus pneumoniae* isolates resistant to macrolides, tetracycline, quinolones or trimethoprim/sulfamethoxazole. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (2001); 20:827-829.
126. Dalhoff A: Comparative in vitro and in vivo activity of the C-8 methoxy quinolone moxifloxacin and the C-8 chlorine quinolone BAY y 3118. Clin. Inf. Dis. (2001) 22: (Suppl.1) S116-22.
127. Critchley IA, Brown SD, Traczewski MM, Tillotson GS, Janjic N: National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in the U.S. 2005-2006 Faropenem Surveillance Study. Antimicrob. Agents Chemother. Published online ahead of print on 1 October 2007. <http://aac.asm.org> (10.1128/AAC.00971-07).
128. Gatifloxacin - Zuwachs bei den Chinolonen. Zeitschrift für Chemotherapie 2001;22:36. Ergänzung Januar und März 2004 (Quelle für die Ergänzungen u. a. Deutsches Ärzteblatt 2004; 101:310).
129. Park-Wyllie LY, Juurlink DN, Kopp A et al.: Outpatient Gatifloxacin Therapy and Dysglycemia in Older Adults. N. Engl. J. Med. (2006); 354:1352-1361. Published online ahead of print on March 1, 2006. ([www.nejm.org](http://www.nejm.org))
130. Pharmazeutische Zeitung online: Gatifloxacin/Bonoq (<http://www.pharmazeutische-zeitung.de>).
131. Nagel H: Risiko für Hypoglykämien und Hyperglykämien durch Anwendung des Antibiotikums Gatifloxacin. (17.03.2006). (<http://www.diabetes-deutschland.de>).
132. Schmidt RE: „Drug Company Taking Tequin Off Market” Associated Press (USA), May 1, 2006.
133. NCBI: PubChem: Information on biological activities of small molecules. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).
134. Replidyne website (<http://www.replidyne.com>).
135. Daiichi Asubio Pharma products page: (<http://www.asubio.co.jp/eng/research.html>).
136. Schurek KN, Wiebe R, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban DJ, Zhanel GG: Faropenem: review of a new oral penem. Expert Rev. Anti Infect. Ther. (2007); 5(2):185-98.
137. Karchmer AW: Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: PROTEKT US - an update. Clin. Infect. Dis. (2004); 39(Suppl 3):S142-S150.
138. Karlowsky JA, Thornsberry C, Jones ME, Evangelista AT, Critchley IA, Sahm DF: Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus*

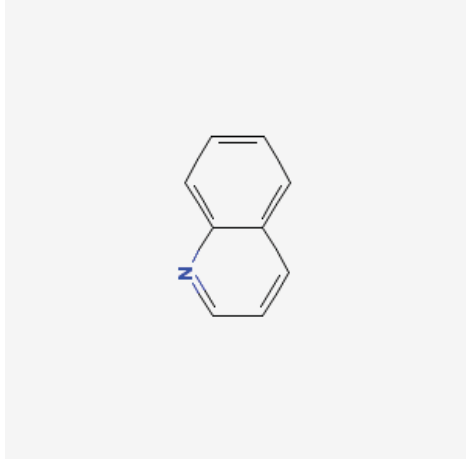


- pneumoniae* in the United States: Results from the TRUST Surveillance Programm (1998-2002). Clin. Infect. Dis. (2003); 36:963-970.
139. Johnson DM, Stilwell MG, Fritsche TR, Jones RN: Emergence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Sureillance Programm (1999-2003). Diagn.Microbiol. Infect. Dis. (2006); 56(1):69-74. Epub 2006 Mar 20.
140. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN, the Alexander Project Group: The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infections to commonly used antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. (2003); 52:229-246.
141. Naber, K et al.: Med. Wschr. (1998); 140:248-250, zuletzt überarbeitet Mai 2004 in der Zeitschrift für Chemotherapie (<http://www.zct-berlin.de>).
142. Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, Doern GV: The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. Clin. Infect. Dis. (2005); 40(2):225-35.
143. Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, Low DE, The Cross Study Group, Hoban DJ: Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* Respiratory Tract Isolates: Results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. Antimicrob. Agents Chemother. (2003); 47(6):1875-1881.
144. Rote Liste 2007 - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. Verlag Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main.
145. Doern GV, Richter SS, Miller A, Miller N, Rice C, Heilmann K, Beekmann S: Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? Clin. Infect. Dis. (2005); 41(2):139-48.
146. Allen GP, Kaatz GW, Rybak MJ: Activities of mutant prevention concentration-targeted moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrob. Agents Chemother. (2003); 47:2606-2614.
147. Garrison MW, Schimmels JA, Madaras-Kelly KJ: In vitro pharmacodynamic activity of gatifloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* containing specific mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (2003); 47:587-593.
148. Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley Jr HP, Sahm DF: Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* isolates to

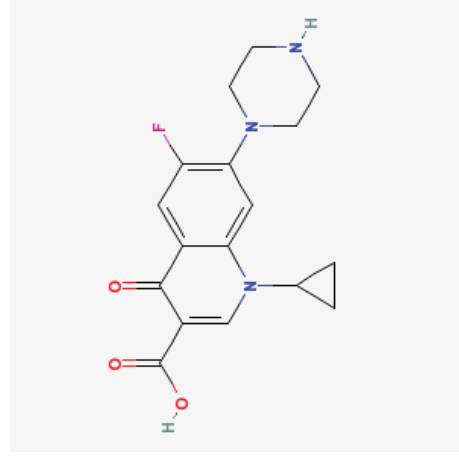
- 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999); 43:2612-2623.
149. Richter SS, Winokur PL, Brueggemann AB, Huynh HK, Rhomberg PR, Wingert EM, Doern GV: Molecular characterization of the  $\beta$ -lactamases from clinical isolates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* obtained from 24 U.S. Medical Centers during 1994-1995 and 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000); 44(2):444-446.
150. Marchese A, Debbia EA, Schito GC: Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander Project. *J. Antimicrob. Chemother.* (2000); 46 (Suppl T1):11-15.
151. DiPersio JR, Jones RN, Barrett T, Doern GV, Pfaller MA: Fluorquinolone-resistant *Moraxella catarrhalis* in a patient with pneumonia: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programm (1998). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (1998); 32:131-135.

## 7. Anhang

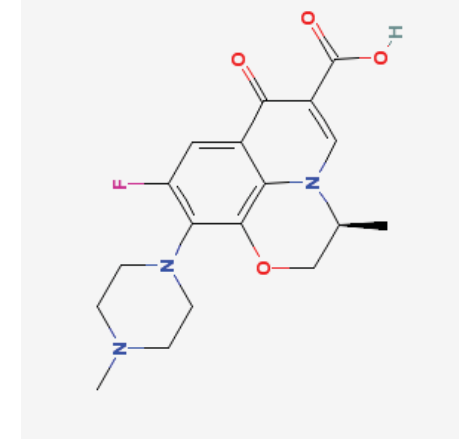
Grundstruktur Chinolin:



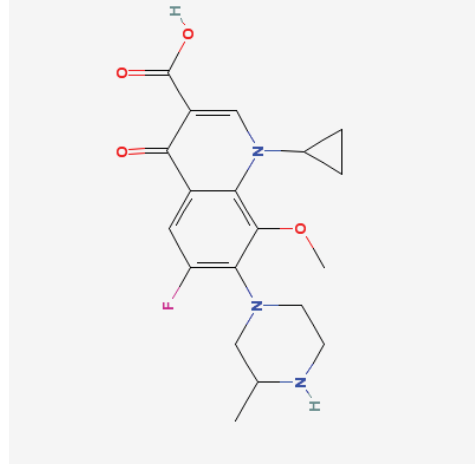
Beispiele für Fluorchinolone:



Ciprofloxacin



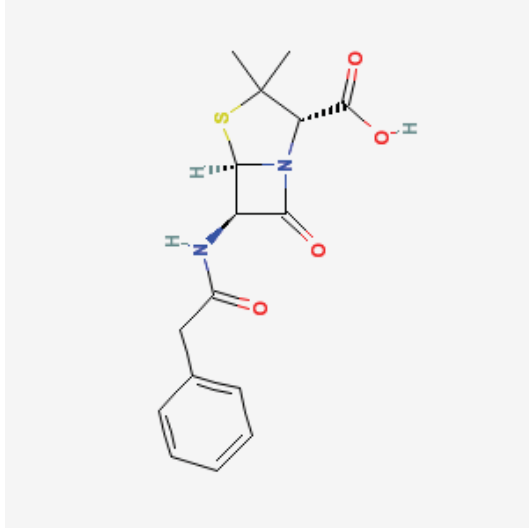
Levofloxacin



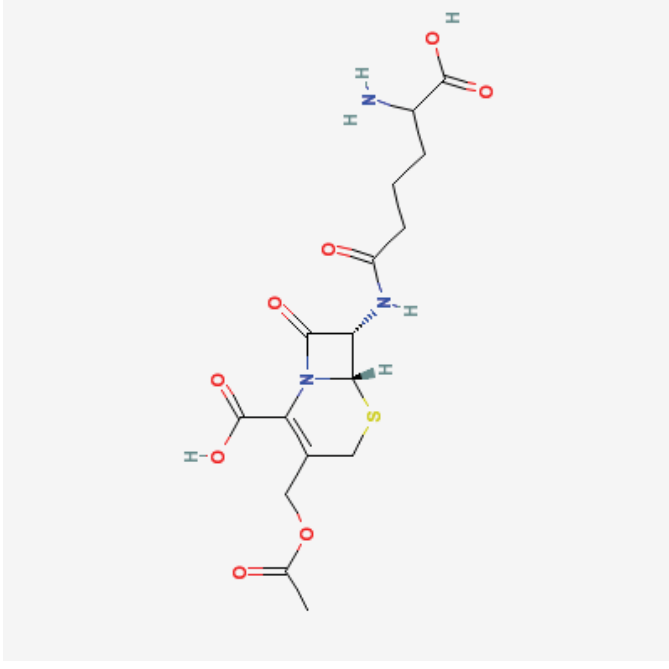
Gatifloxacin

Abb. 1: Strukturformeln verschiedener Chinolone

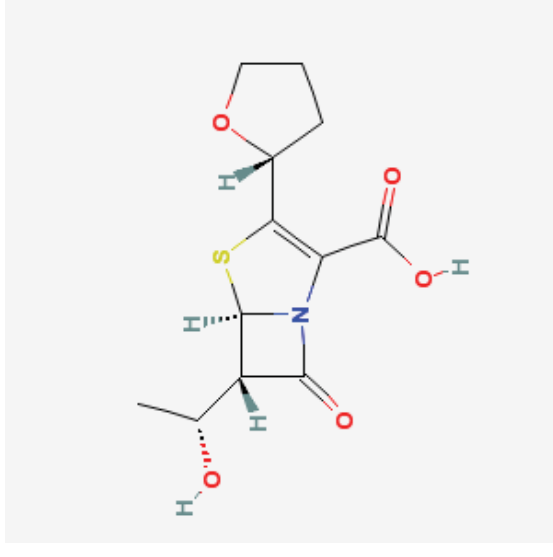
$\beta$ -Laktam-Antibiotika:



Penicillin G



Cephalosporin



Faropenem

Abb. 2: Strukturformeln verschiedener  $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Stamm Nr.:	Tag: 0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,25	0,5	2	4	8	64	64	64	64	64	64
2	0,25	0,25	1	2	4	8	16	16	16	16	16
3	1	2	8	8	8	8	8	16	32	64	64
4	1	1	2	2	8	8	8	8	8	8	64
5	1	1	2	2	2	4	4	4	4	4	4
6	0,25	1	2	4	8	16	32	32	32	64	64
7	2	2	8	32	32	32	64	64	64	64	64
8	32	16	32	32	64	64	64	64	64	64	64
9	1	1	4	4	4	8	8	16	16	16	64
10	1	1	4	4	4	8	8	8	16	16	16
11	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1
12	0,5	1	4	4	4	8	32	32	32	64	64
13	1	1	4	4	4	8	16	32	32	64	64
14	0,5	0,5	2	2	2	16	32	32	32	64	128
15	0,5	0,5	1	2	4	8	8	8	16	32	32
16	0,5	0,5	2	4	8	8	8	16	16	16	32
17	1	1	2	4	4	16	32	32	64	128	128
18	1	1	4	4	4	8	16	16	32	32	32
19	1	1	2	4	8	8	8	8	8	8	16
20	1	1	2	4	8	8	8	16	16	16	32

Tabelle 6: Resistenzentwicklung von 20 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Ciprofloxacin: MHK-Werte über 10 Tage (\* MHK Tag 0 = MHK Wildtyp)

Stamm Nr.:	Tag: 0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	2	16	64	128
2	0,06	0,125	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1
3	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	4	4
4	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1
5	0,25	0,25	0,5	0,5	1	8	8	8	8	8	8
6	0,06	0,25	0,5	2	4	8	32	32	32	64	64
7	0,125	0,5	0,5	2	8	8	8	8	8	8	8
8	4	4	4	8	16	16	32	32	64	64	64
9	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	1	1	2	2	2	2
10	0,25	0,25	0,5	0,5	1	4	4	4	4	4	8
11	0,06	0,06	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
12	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
13	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1
14	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	1	4	4	4	4	8
15	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2
16	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	2	2
17	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
18	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1	2	8	8	16	16
19	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
20	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabelle 7: Resistenzentwicklung von 20 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Gatifloxacin: MHK-Werte über 10 Tage (\* MHK Tag 0 = MHK Wildtyp)

Stamm Nr.:	Tag 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,5	0,5	1	1	1	2	8	16	16	16	32
2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	2
3	1	1	2	2	4	4	4	4	4	4	4
4	0,5	0,5	1	1	1	1	1	4	4	4	8
5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	2	2	2	2
6	1	1	1	2	4	4	4	8	8	16	32
7	2	2	4	4	8	8	8	16	32	32	64
8	8	8	8	16	16	16	16	16	16	32	128
9	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	2	2
10	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1
12	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	2	16
13	1	1	1	2	2	2	2	2	4	4	4
14	0,5	0,5	0,5	1	2	16	16	32	64	64	128
15	0,5	0,5	1	2	2	2	4	8	16	16	16
16	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	2	4	4	16
17	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	2	2	8	16
18	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	4
19	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	2	2	2	2
20	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2

Tabelle 8: Resistenzentwicklung von 20 *S. pneumoniae* Stämmen gegenüber Levofloxacin: MHK-Werte über 10 Tage (\* MHK Tag 0 = MHK Wildtyp)

Stamm Nr.	Ausgangs-MHK in mg/l		Resistenzentwicklung		Alteration in der QRDR von		MHK-Werte der selektierten Mutanten von Tag 10 für sechs verschiedene Fluorchinolone (in mg/l)					
	Ciprofloxacin	Gatifloxacin	Substanz	Stufen*	Gyr A	Par C	Ciprofloxacin	Gatifloxacin	Clinafloxacin	Gemifloxacin	Moxifloxacin	Sparfloxacin
1	0,25	0,125	Ciprofloxacin	8	Ser81-hPhe	Ser79-hTyr	64	8	0,5	0,5	2	8
			Gatifloxacin	9	Ser81-hPhe	Ser79-hTyr	32	64	8	1	16	32
2	0,25	0,06	Ciprofloxacin	5	-	-	8	0,5	0,25	0,125	0,06	0,125
			Gatifloxacin	4	-	-	4	1	0,25	0,125	0,5	0,5
3	1	0,25	Ciprofloxacin	6	Ser81-hPhe	Ser79-hTyr Asp83-hGly	64	8	1	0,5	2	8
			Gatifloxacin	5	Ser81-hPhe	Asp83-hGly	32	8	1	0,5	4	16
4	1	0,25	Ciprofloxacin	6	Ser81-hPhe	Lys137-hAsn, Ser79-hTyr, Asp83-hGly	64	8	1	0,5	2	8
			Gatifloxacin	2	-	Lys137-hAsn	8	1	0,25	0,25	0,5	2
5	1	0,25	Ciprofloxacin	1	-	Lys137-hAsn	2	0,5	0,125	0,06	0,25	0,25
			Gatifloxacin	6	Ser81-hTyr	Ser79-hPhe	16	16	0,5	0,25	4	32
6	0,25	0,06	Ciprofloxacin	8	Ser81-hPhe	Ser79-hTyr	64	4	0,5	0,5	2	4
			Gatifloxacin	10	Ser81-hPhe	Ser79-hPhe	8	64	4	2	16	8

Tabelle 9: Resistenzentwicklung und Sequenzierung von 6 *S. pneumoniae* Stämmen

\* Stufen: MHK-Stufen, um die sich der MHK-Wert der Mutanten am 10. Tag gegenüber dem MHK-Wert des Ausgangsisolates erhöht hat.



Antibiotikum - MHK (mg/l)									
Phäno-/ Genotyp	Ciprofloxacin			Levofloxacin			Gatifloxacin		
	MHK50	MHK90	Minimal- Maximal- Bereich	MHK50	MHK90	Minimal- Maximal- Bereich	MHK50	MHK90	Minimal- Maximal- Bereich
$\beta$ -Lactamase negativ (n=32)	$\leq 0,015$	0,03	$\leq 0,015$ - 0,25	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ - 1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$ - 0,12
$\beta$ -Lactamase positiv -BRO-1- (n=359)	$\leq 0,015$	0,03	$\leq 0,015$ - 0,5	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$ - 1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$ - 0,25
$\beta$ -Lactamase positiv -BRO-2- (n=21)	$\leq 0,015$	0,03	$\leq 0,015$ - 0,06	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$

Tabelle 12: Sensibilität von 412 *Moraxella catarrhalis* Stämmen gegenüber den Chinolonen Cipro-, Levo- und Gatifloxacin

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz für die Überlassung des interessanten Themas, sowie die unermüdliche Unterstützung und wunderbare Betreuung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener möchte ich mich für die Übernahme der Korreferentschaft bedanken.

Weiterhin danken möchte ich allen Mitarbeitern der Mikrobiologie und Virologie, den medizinisch-technischen Assistenten, Diplomanden und Doktoranden, den Mitarbeitern der Nährbodenküche, sowie den Mitarbeitern des BMFZ für die tatkräftige Unterstützung und sehr nette Arbeitsatmosphäre.

**9. Lebenslauf*****Persönliche Daten***

Name, Vorname:	Selaru, Alexandra
Anschrift:	Innstrasse 18 47269 Duisburg
Geburtsdatum:	15. Oktober 1977
Geburtsort:	Bukarest (Rumänien)
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Dipl. Ing. Alexander Selaru und Dipl. Ing. Ella Selaru, geb. Rubel

***Schulausbildung***

1984 - 1988	Grundschule in Bukarest
1988 - 1997	Karl-Ziegler-Gymnasium Mülheim/Ruhr Abschluss: Abitur

***Hochschulausbildung***

Frühjahr 1998 -Frühjahr 2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Frühjahr 2000	Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19. April 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>Praktisches Jahr</i>	
04/2003 - 08/2003	Innere Med., Ev. Krankenhaus Düsseldorf
08/2003 - 11/2003	Chirurgie, Univ.Klinik Nantes, Frankreich
12/2003 - 03/2004	Anästhesie, Ev. Krankenhaus Düsseldorf

***Berufliche Laufbahn***

Seit 01. August 2004	Ärztin im Praktikum, dann Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik des Malteser Krankenhauses St. Anna Duisburg
----------------------	---

# **Molekularbiologische Evaluation der Therapiemöglichkeiten von Gatifloxacin als Chinolon und Faropenem als Betalaktamantibiotikum**

**vorgelegt von**

**Alexandra Selaru**

*Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* zählen zu den häufigsten Erregern von Atemwegserkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurden klinische *S. pneumoniae* Isolate aus Europa bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Gatifloxacin verglichen mit anderen Chinolonen untersucht. Gatifloxacin zeigte die höchste in-vitro Wirksamkeit, wie für die C8-Methoxy-Fluorchinolone vermutet. Durch in-vitro Selektionsversuche sollte ermittelt werden, ob und wie schnell eine Resistenzentwicklung der Pneumokokken gegenüber Gatifloxacin erfolgt. Diese zeigten, dass gegenüber allen Chinolonen eine Resistenzentwicklung mit Selektion klinisch resistenter Isolate eintrat, allerdings unterschiedlich schnell. Die Resistenzentwicklung der *S. pneumoniae* Isolate verlief gegenüber Gatifloxacin etwas langsamer. Um die Gründe für die Entstehung von Resistenzen näher zu untersuchen, wurden die resistenten Stämme sequenziert. Dabei fanden sich die klassischen Mutationen in den *gyrA*- und *parC*-Genen der Chinolon-Zielstrukturen Gyrase und Topoisomerase IV, wobei die *parC*-Alterationen deutlich überwogen, was dafür spricht, dass die Topoisomerase IV das primäre Target von Gatifloxacin ist. Um mögliche Alternativtherapien im Falle von Chinolon-Resistenz zu bewerten, wurde die Wirksamkeit des Faropenems, eines neuartigen, zur oralen Anwendung bestimmten Penems, gegenüber klinisch resistenten *S. pneumoniae* Isolaten untersucht. Alle untersuchten Isolate erwiesen sich als Faropenem-sensibel. Des Weiteren wurden die Experimente zur Empfindlichkeits-Bestimmung anhand klinischer *M. catarrhalis* Isolate wiederholt. Sowohl die Chinolone als auch Faropenem zeigten gute Wirksamkeit ohne Hinweise für Resistenzen. Die Sequenzierung der Gene ergab eine Rate an  $\beta$ -Laktamase-Produzenten von 92,2%. Davon waren 94,5% BRO-1- und lediglich 5,5% BRO-2-Stämme. Die BRO-1 produzierenden Stämme wiesen für Penicillin und Faropenem deutlich höhere MHK-Werte auf als die BRO-2-Stämme. Diese Resistenz scheint hauptsächlich durch die bereits bekannte 21 bp Deletion verursacht zu werden. Zusammenfassend belegen die vorliegenden Ergebnisse die gute Wirksamkeit von Faropenem und Gatifloxacin gegenüber den Erregern von Infektionen des respiratorischen Traktes, aber eine kontinuierliche Surveillance ist sehr wichtig.