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

Epidemiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und dem neuen Des-F6-Chinolon BMS-284756 bei *Staphylococcus aureus, Streptococcus spp.,* und *Enterobacteriaceae*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Vorgelegt von
Stephanie Dömkes
2008

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan
Referent: Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Däubener

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **2**

Abbildungsverzeichnis **6**

Tabellenverzeichnis **8**

Abkürzungsverzeichnis **10**

1 Einleitung **14**

1.1 Die Entwicklung der antiinfektiven Chemotherapie - ein geschichtlicher Überblick ..14

1.2 Definitionen 15

1.3 Bakterien 16

1.3.1 Staphylokokken 16

1.3.2 Streptokokken 20

1.3.3 Enterobakterien 22

1.4 Entwicklung der Chinolon-Antibiotika 24

1.5 Einteilung der Chinolone 25

1.6 Chemie und Struktur-Wirkungsbeziehung 28

1.7 BMS-284756 29

1.8 Wirkungsmechanismus der Chinolone 30

1.8.1 DNA-Gyrase 31

1.8.2 Topoisomerase IV 33

1.8.3 Wirkung der Chinolone in der Zelle 33

1.9 Resistenzmechanismen 34

1.10 Epidemiologie 38

2 Zielsetzung **41**

3 Material und Methoden **44**

3.1 Material 44

3.1.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen 44

3.1.2 Antibiotika 45
3.1.3 Fertig-Kits 46
3.1.4 Nährmedien 46
3.1.5 Primer 47
3.1.6 Geräte 49
3.1.7 Plastik- und Einwegartikel 50
3.1.8 Bakterienstämme 50
3.2 Methoden 51
3.2.1 Mikrobiologische Methoden 51
3.2.1.1 Anzucht von Bakterien 51
3.2.1.2 Bakterienkonservierung 51
3.2.1.3 Wachstumsmessung 51
3.2.1.4 Messung der optischen Dichte 52
3.2.1.5 Bestimmung der Lebendkeimzahl 52
3.2.1.6 Sterilisation 52
3.2.1.7 Methoden zur Identifizierung von Bakterien 53
3.2.1.8 Resistenzprüfungen 56
3.2.2 Molekularbiologische Methoden 59
3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 59
3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese 60
3.2.2.3 Aufreinigung 62
3.2.2.4 Sequenzierreaktion 63
3.2.2.5 DNA-Fällung 63
3.2.2.6 Sequenzierung 64
3.2.2.7 Pulsgelfeldelektrophorese 65

4 Ergebnisse 66

4.1 Epidemiologische Resistenzverteilung 66

4.1.1 *Staphylococcus aureus* 66

4.1.2 *Streptococcus pneumoniae* 69

4.1.3 *Enterobacteriaceae* 71

4.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen 72

4.2.1 *S. aureus* 72

4.2.2 *S. pneumoniae* 76

4.2.3 *Enterobacteriaceae* (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*) 80

4.3 BMS-294756 87

4.3.1 Unterschiede in der Resistenzentwicklung von *S. aureus, S. pneumoniae* und *S. pyogenes* gegenüber 6 verschiedenen Chinolonen und BMS-284756 im Überblick 88

4.3.2 Vergleich der in vitro-Aktivität von BMS-284756 und anderen Chinolonen gegenüber *S. aureus*, S. pneumoniae und anderen Streptokokken-spp. 100

4.3.2.1 *Staphylococcus aureus* 101

4.3.2.2 *Streptococcus spp.* 107

4.3.2.2.1 *S. pneumoniae* 107

4.3.2.2.2 Andere Streptokokken-spp. 112

4.3.3 Resistenzentwicklung einer großen Anzahl klinischer *S. pneumoniae*-Isolate gegenüber BMS-284756 und verschiedenen Chinolonen 115

4.3.4 *Enterobacteriaceae* 118

4.3.4.1 Vergleich der in vitro-Aktivität von BMS-284756, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin gegenüber *E.coli, K. pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* 119

4.3.4.2 Resistenzentwicklung von *Enterobacteriaceae* gegenüber BMS-284756 und verschiedenen Chinolonen 123

5 Diskussion und Ausblick 126

5.1 *S. aureus, S. pneumoniae, Enterobacteriaceae* und die Fluorchinolone 126

5.1.1 Epidemiologische Resistenzverteilung....127

5.1.1.1 *S. aureus*....127

5.1.1.2 *S. pneumoniae*....128

5.1.1.3 *Enterobacteriaceae*....129

5.1.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen....130

5.1.2.1 *S. aureus*....130

5.1.2.2 *S. pneumoniae*....131

5.1.2.3 *Enterobacteriaceae* (*E. aerogenes*, *E. cloacae, K. pneumoniae* und *K. oxytoca*)....132

5.1.3 BMS-284756....135

5.1.3.1 Unterschiede in der Resistenzentwicklung von *S. aureus, S. pneumoniae* und *S. pyogenes* gegenüber 6 verschiedenen Chinolonen und BMS-284756 im Überblick....136

5.1.3.2 *S. aureus* und *S. pneumonia*....139

5.1.3.3 Untersuchung der in vitro-Aktivität von BMS-284756 gegenüber einer großen Anzahl *S. pneumoniae*-Stämmen mit verschiedenen Resistenzphänotypen und verschiedenen anderen Streptokokken-Spezies....141

5.1.3.4 *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae*....141

5.2 Ausblick....143

6 Zusammenfassung....150

7 Literatur....153

8 Anhang....185

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln der 4-Oxochinolin-3-Carbonsäure und verschiedener Chinolone..... .....**29**

Abbildung 2: Strukturformel von BMS-284756……. **30**

Abbildung 3: Bildung von „Über-Helices“ **32**

Abbildung 4: Chinolon-DNA-Bindungsmodell.....**34**

Abbildung 5: Gelbild einer PCR nach erfolgter Elektrophorese (*Enterobacter spp.*)…….. .....**61**

Abbildung 6: Gelbild einer aufgereinigten PCR *(S. pneumoniae)*…….....**62**

Abbildung 7: Darstellung einer Mikrotiterplatte **67**

Abbildung 8: Europäischer Vergleich der Fluorchinolonresistenz.....**68**

Abbildung 9: Fluorchinolonresistenz bei Pneumokokken **70**

Abbildung 10: Agarosegel mit PCR-Produkten der Amplifikation der QRDRs von *gyrA* und *grlA* bei *S. aureus* **73**

Abbildung 11: Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Fragmente von MRSA für *gyrA* und *grlA* **74**

Abbildung 12: Häufigkeiten der ermittelten Mutationskombinationen für *S. aureus* **74**

Abbildung 13: : Lage der QRDR im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *grlA* für *S. aureus*.....**75**

Abbildung 14: Agarosegel mit Darstellund der PCR-Produkte der QRDR von *S. pneumoniae*..... 76

Abbildung 15: Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Produkte von *S. pneumoniae*.....**76**

Abbildung 16: Lage der QRDR im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *parC* und *parE* für *S. pneumoniae*.....**78-79**

Abbildung 17: Resistenzentwicklung des *S. aureus*-Stammes 3SA **95**

Abbildung 18: Resistenzentwicklung des *S. pneumoniae*-Stammes 5SP **95**

Abbildung 19: Resistenzentwicklung des *S. pyogenes* 4SPY **96**

Abbildung 20: Agarosegel mit PCR-Fragmenten der QRDR von *grlA* und *grlB*.....**101**

Abbildung 21: MHK90-Werte von BMS und verschiedener Chinolone bei den jeweiligen Resistenzgruppen von *S. pneumoniae* **112**

Abbildung 22: Anstiege der MHK-Werte von *S. pneumoniae* relativ zu den individuellen Ausgangswerten **116**

Abbildung 23: Geschwindigkeiten der Resistenzentwicklung bei *S. pneumoniae*.....**117**

Abbildung 24: Anstiege der MHK-Werte von *Enterobacteriaceae* relativ zu den individuellen Ausgangswerten **123**

Abbildung 25: Geschwindigkeiten der Resistenzentwicklung der *Enterobacteriaceae*.....**124**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Mutationen in *gyrA* und *parC/ grlA* bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* und korrelierende MHK-Werte für Ciprofloxacin **37**

Tabelle 2: Identifizierung der verwendeten *E. aerogenes*- und *E. cloacae*-Stämme …….....**55**

Tabelle 3: Identifizierung der verwendeten *Klebsiella-spp*.-Isolate.....**56**

Tabelle 4: MHK90-Werte diverser Fluorochinolone bei Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten aus Europa.....**68**

Tabelle 5: Verteilung der MHK-Werte diverser Fluorochinolone bei Pneumokokken …….....**69-70**

Tabelle 6: Mutationen und MHK-Werte bei Pneumokokken mit Ciprofloxacinresistenz …….....**77**

Tabelle 7: Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC* bei vier verschiedenen *Enterobacteriaceae-spp.* **82**

Tabelle 8: Korrelation der MHK mit Mutationen in den *gyrA*- und *parC*-Genen der *Enterobacteriaceae-spp.*.....**84-86**

Tabelle 9: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei 6 *S. aureus*-Stämmen.....**88-90**

Tabelle 10: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei *S. pneumoniae*-Stämmen **90-92**

Tabelle 11: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei 6 *S. pyogenes*-Stämmen.....**92-94**

Tabelle 12: : Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der 6 *S. aureus*-Isolate bei Zugabe von Reserpin..... .....**98**

Tabelle 13: Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der 6 *S. pneumoniae*-Isolate bei Zugabe von Reserpin.....**99**

Tabelle 14: Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der 6 *S. pyogenes*-Isolate bei Zugabe von Reserpin.....**100**

Tabelle 15: *S. aureus*: Alterationen und resultierende Aminosäureaustausche in *gyrA, grlB* und *gyrA* und entsprechende MHK-Werte **103-105**

Tabelle 16: *S. pneumoniae*: Alterationen und resultierende Aminosäureaustausche in *gyrA* und *parC* mit entsprechenden MHK-Werten.....**108**

Tabelle 17: Aktivität gegen Pneumokokken mit verschiedenen Resistenzphänotypen für BMS und vier weitere Chinolone.....**111**

Tabelle 18: MHK-Bereiche, MHK50- und MHK90-Werte von BMS und vier weiteren Chinolonen gegenüber verschiedenen Streptokokken-Spezies.....**114**

Tabelle 19: Durchschnittliche MHK-Werte der 50 verschiedenen *E. coli-, K. pneumoniae-* und *E. cloacae* Ausgangsisolate.....**119**

Tabelle 20: MHK-Bereiche von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *E. coli*.....**120**

Tabelle 21: MHK-Bereiche von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *K. pneumoniae*.....**121**

Tabelle 22: MHK-Bereiche von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *E. cloacae*.....**122**

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ANOVA	analysis of variance between groups
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under curve
BMS	Bristol-Myers Squibb
Bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
c	Konzentration
C	Cytosin
CCD	Charged Coupled Device
Cipro/ CIP	Ciprofloxacin
Clina	Clinafloxacin
CRP	C-reaktives Protein
d	Schichtdicke
DB	Dextranblau
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleotidphosphate
e	molarer Absorptionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EHEC	enterohämorrhagische *Escherichia coli*
EIEC	enteroinvasive *Escherichia coli*
EPEC	enteropathogene *Escherichia coli*
ESBL	extended spectrum beta-lactamase
ETEC	enterotoxische *Escherichia coli*
G	Guanin
Gati/ GAT	Gatifloxacin

Gemi/ GEM	Gemifloxacin
Grepa	Grepafloacin
h	Stunde
hetero-VISA	heterogeneous intermediate resistance to Vancomycin in *S. aureus*
HF	Hydrogeniumfluorid
I	Ausgangslichtstärke
I_0	Eingangslichtstärke
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildenden Einheiten
l	Liter
Levo/ LEV	Levofloxacin
M	Molar
MFS	Major Facilitator Superfamily
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MH	Mueller-Hinton
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	minmal inhibitory concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Moxi/ MOX	Moxifloxacin
MPC	mutant prevention concentration
MRSA	Methicillin-resistenter *S. aureus*
MSSA	Methicillin-sensibler *S. aureus*
nm	Nanometer
PAE	post-antibiotic effect

p.a.	per annum
PBP	Penicillin-binding Protein
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
PRSP	penicillin-resistant *S. pneumoniae*
qnr	quinolone resistance
QRDR	Quinolone-resistance-determining-region
RES	Reserpin
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunden
Sita	Sitafloxacin
Spar	Sparfloxacin
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Trova	Trovafloxacin
TSB	Tryptic-Soja-Bouillon
TSST1	Toxic-Shock-Syndrom Toxin 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

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
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 Die Entwicklung der antiinfektiven Chemotherapie – ein geschichtlicher Überblick

Bis in das 20. Jahrhundert waren Infektionskrankheiten wie Lungenentzündung, Scharlach, Syphilis, Kindbettfieber und Wundinfektionen die häufigsten Todesursachen, denn die empirische Medizin früherer Jahrhunderte kannte nur wenige spezifisch antiinfektiv wirksame Mittel. So verwendete der Augustinermönch Antonio de la Calancha um 1600 erstmals die Rinde der Chinchona („Chinin“) zur Fieberbekämpfung bei Malaria. Zur lokalen Entzündungshemmung sind die Quecksilbersalbe gegen Syphilis (Fracastoro, 1483-1553), das Phenol gegen Wundinfektionen (Joseph Lister, 1867) und die Silbernitratlösung gegen Gonoblenorrhoe des Neugeborenen (Carl Credé, 1884) hervorzuheben. Der Begriff „Chemotherapie“ wurde erst 1906 von Paul Ehrlich geprägt, der seine Zielsetzung folgendermaßen definierte: selektive „Abtötung der Parasiten ohne erhebliche Schädigungen des Organismus“. Aus Atoxyl, einem Arsen-Derivat des Anilins, entwickelte er das Neosalvarsan®, das erste Chemotherapeutikum gegen Syphilis. 1935 gelang Domagk der Beweis der Streptokokkenwirksamkeit des Prontosils. Dies leitete die Entwicklung der Sulfonamide und allgemein die Suche nach synthetisch hergestellten Chemotherapeutika ein. Diese Ereignisse überschatteten zeitweise die Beschreibung der antibakteriellen Aktivität des Naturstoffes Penicillin durch Alexander Fleming 1929. Seine Entdeckung verfolgend gelang es 1940 E. Chain und H. W. Florey, Methoden zur Gewinnung großer Penicillinmengen zu entwickeln, denn der hohe therapeutische Wert gegen viele bakterielle Infektionen wurde durch die herrschende Kriegszeit dramatisch gesteigert.
Weitere Meilensteine der stürmisch verlaufenden Entwicklung der Chemotherapeutika stellen die Isolierung des Streptomycins, des u.a. ersten Tuberkulosemittels, 1943 durch Waksman, und die Entwicklung der Cephalosporine 1948 dar.
Diese bahnbrechenden Entdeckungen markieren nur den Beginn eines faszinierenden Siegeszuges der Arzneimittelforschung zu den heute verfügbaren hochaktiven Substanzen. Doch die bakterielle Resistenzentwicklung stellt immer neue Anforderungen, denn für manche Bakterien scheinen auch die „modernsten“ Antibiotika immer wieder keine „unbekannte Überraschung“ zu bieten *(Rosin, 1996)*. Für den behandelnden Arzt ist es daher wichtig zu wissen, welche Antibiotika noch bedenkenlos eingesetzt werden können.
In der vorliegenden Arbeit sollen die Resistenzeigenschaften für die Antibiotikaklasse der Chinolone von den verbreiteten Erregern *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*

sowie weiteren *Streptococcus spp.* und den Enterobakterien untersucht werden, wobei besonders intensiv auf die neue Substanz BMS-284756 eingegangen werden soll.

1.2 Definitionen

Der folgende Abschnitt dient der Klärung einiger häufig verwendeter Begriffe und soll das Verständnis des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materials fördern.

Unter Chemotherapeutika versteht man im klassischen Sinne chemisch-synthetisch hergestellte, antimikrobiell wirksame Substanzen, z.B. die Sulfonamide.

Demgegenüber sind Antibiotika ursprünglich definiert als biosynthetisch gewonnene, antibakteriell wirksame Naturstoffe. Sie werden v. a. von Bakterien und Pilzen im Erdreich gegen die Konkurrenz anderer Mikroorganismen produziert. Diese Bezeichnung wird jedoch häufig auf alle antibakteriellen Pharmaka ausgedehnt.

Unter Bakteriostase versteht man die reversible antibiotische Hemmung des Wachstums bzw. der Vermehrung einer Bakterienpopulation. Bakterizidie meint hingegen die irreversible Schädigung oder Abtötung einer Bakterienpopulation.

Der Begriff der antibakteriellen Resistenz ist als relativ zu verstehen, mit dem das Ausmaß der Unempfindlichkeit von Bakterien gegen eine Substanzklasse beschrieben wird. Man unterscheidet die natürliche von der erworbenen Resistenz. Unter natürlicher Resistenz versteht man die Unempfindlichkeit von allen Stämmen einer Spezies gegen bestimmte Antibiotika; es resultieren definierte Lücken im Wirkspektrum der Substanz. Ein Beispiel ist die Unempfindlichkeit gramnegativer Erreger gegenüber Penicillin, das durch die β-Laktamasen dieser Spezies gespalten wird. Im Fall der erworbenen Resistenz kann es sich molekulargenetisch um eine punktuelle Veränderung der DNA, eine Mutation handeln. Diese hat entweder eine qualitative (strukturelle) oder eine quantitative (regulatorische) Veränderung der für die Wirkung verantwortlichen molekularen Zielstruktur zur Folge. Man unterscheidet die primäre Form, die ohne Kontakt zum Antibiotikum auftritt, und die sekundäre Form, die sich unter dem Selektionsdruck einer antiinfektiven Therapie entwickelt. Andererseits kann zusätzliche extrachromosomal gelegene ringförmige genetische Substanz des Bakteriums (Plasmide oder Prophagen) für die Resistenzentwicklung verantwortlich sein. Bestimmte Bruchstücke dieser Substanz, Transposons, können von einem Plasmid auf ein anderes oder auch auf das Chromosom überspringen. Durch den damit verbundenen Genaustausch sind vielfältige und rasche Veränderungen der genetischen Information möglich, was eine äußerst flexible Anpas-

sungs- und Überlebensfähigkeit der Keime nach sich zieht. Ein Beispiel für die erworbene Resistenz ist die im folgenden beschriebene Resistenz gegenüber Chinolonantibiotika.
Die minimale Hemmkonzentration (MHK), ab der ein Stamm als resistent angesehen wird, ist der biologische Grenzwert der Resistenz. Darunter versteht man die niedrigste Antibiotika-Konzentration, ab der – unter standardisierten in-vitro Bedingungen – eine bakteriostatische Hemmung des Inokolums eintritt. In diesem Zusammenhang ist auch die minimale bakterizide Konzentration (MBK) zu nennen. Das ist die niedrigste Antibiotikum Konzentration, ab der – ebenfalls unter standardisierten Bedingungen – die Abtötung von mindestens 99,9% der inokulierten Bakterien einsetzt. Sie ist immer mehr oder weniger größer als die MHK. Für den Einsatz der Chemotherapeutika in der Klinik wurde außerdem der Begriff der klinischen Resistenz eingeführt. Er definiert die Eigenschaft von Mikroorganismen, sich bei therapeutisch relevanten Konzentrationen noch zu vermehren (Rosin, 1996).
Die bakterielle Resistenz ist seit den Anfängen der Antibiotikaära der Ausgangspunkt für weltweite Bemühungen zur Entwicklung neuer Substanzen gewesen. Eine dieser Substanzklassen ist die der Fluorchinolone**,** die hier näher beschrieben werden soll. In den letzten Jahren sind viele neue Vertreter dieser Klasse entwickelt worden, die sowohl eine höhere Wirksamkeit als auch ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen, insbesondere grampositive Erreger betreffend.

1.3 Bakterien

1.3.1 Staphylokokken

a) Morphologie und klinische Bedeutung

Staphylococcus aureus gehört zur Familie der *Micrococcaceae*. Es handelt sich um kleine (1 µm) kugelige bis ovale Zellen, die sich in Haufen oder Trauben anordnen und die unbeweglich sind. Der Keim ist fakultativ anaerob und bildet Koagulase und Katalase. Nach Kultivierung findet man porzellanartig aussehende, konvex gewölbte Kolonien, die meist gelblich pigmentiert und von β-Hämolysezonen umgeben sind.
S. aureus gehört zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen beim Menschen. Besonders immungeschwächten Patienten kann er gefährlich werden als Erreger von nosokomialen, d.h. im Klinikum erworbenen Infektionen.
Er verursacht nicht nur invasive, lokale eitrige Infekte, wie Furunkel, Karbunkel, Impetigo, Wundinfekte, Sinusitis, Otitis media, Mastitis puerperalis, Ostitis, Pneumonie nach Influenza und Sepsis, sondern auch toxinbedingte Erkrankungen, wie Lebensmittelvergiftungen durch

Enterotoxinproduktion (Dinges *et al.*, 2000), und Mischformen wie die Dermatitis exfoliativa, den Pemphigus neonatorum, die bullöse Impetigo und das Toxischer-Schock-Syndrom (Dinges *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2001).

Von besonderer Relevanz unter den *S. aureus*-Stämmen, die in Krankenhäusern auftreten, sind, aufgrund der mit ihnen verbundenen therapeutischen Schwierigkeiten, die Methicillin-resistenten Stämme (MRSA) (Archer *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1998). Methicillin ist ein semisynthetisches Penicillinase-festes β-Laktam-Antibiotikum. Besonders problematisch ist, dass neben der Methicillinresistenz zahlreiche Multiresistenzen auftreten (Schmitz *et al*, 1997). So konnten bei MRSA-Isolaten nicht nur Resistenzen gegen alle Antibiotika mit β-Laktam-Struktur wie Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobacteme nachgewiesen werden, sondern auch gegen sehr viele andere Antibiotikaklassen. Hervorzuheben sind hier vor allem die Makrolide, die Lincosamide und die Gyrasehemmer, zu denen die Fluorchinolone gehören (Archer *et al,* 1998; Schmitz *et al,*1998). Häufig besteht lediglich noch eine Empfindlichkeit gegen die beiden Glycopeptide Teicoplanin und Vancomycin, allerdings droht auch hier schon die Gefahr einer Resistenzentwicklung (Mulligan *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2006). Zusätzlich erhöht der intensive Antibiotikaeinsatz im Krankenhaus, insbesondere von Breitbandantibiotika, das Risiko einer MRSA-Infektion, da so ein künstlicher Selektionsvorteil für resistentere Keime geschaffen wird. Besonders betroffen sind hier die Großkliniken, wo derartige Infektionen auch eine wesentliche Ursache der Mortalität ausmachen (Emori *et al.*,1993; Martone *et al.*, 1992).

Der bei Methicillinresistenz wirksame Mechanismus ist die Bildung eines neuen, zusätzlichen penicillinbindenden Proteins, des sogenannten PBP2A. Dieses Protein ist ein mebrangebundenes Enzym, welches an der Bakterienzellwandsynthese beteiligt ist. Normalerweise binden alle β-Laktam-Antibiotika kovalent an die PBP, wobei die Zellwandsynthese unterbrochen und das Zellwachstum gehemmt wird. MRSA verfügt nun neben den üblichen PBP 1-4 über das zusätzliche PBP2a, welches eine wesentlich geringere Affinität zu den β-Laktam-Antibiotika besitzt. Auf diese Weise entsteht ein alternativer Stoffwechselweg zur Bildung einer intakten Zellwand und dies hat zur Folge, dass MRSA resistent sind gegen alle Antibiotika, die eine β-Laktam-Struktur aufweisen (Bradley *et al.*, 1992; Schmitz, 1996). Zentrale Bedeutung für die Entwicklung der Methicillin-Resistenz kommt daher dem mecA-Gen zu, welches das Protein PBP2a kodiert und über das die meisten MRSA in der Regel verfügen (De Lencastre *et al.*, 1991; De Lencastre *et al.*, 1994).

Sogenannte low-level-resistente MRSA verfügen hingegen nicht über das mecA-Gen und dementsprechend auch nicht über das Protein PBP2a. Kommt eine Resistenz gegenüber

Methicillin in mecA-negativen Stämmen vor, so ist dies auf eine gesteigerte β-Laktamase-Produktion, die Bildung eines normalen PBP mit herabgesetzter Bindungskapazität, die Produktion einer neu beschriebenen Methicillinase, sowie auf einige noch unbekannte Faktoren zurückzuführen. Die low-level-Resistenz hat allerdings bisher nur geringe klinische Bedeutung erlangt (Schmitz, 1996).

b) Resistenzgene in *S. aureus* und deren Übertragung

Da jeweils verschiedene Mechanismen (und daher verschiedene Gene) an der Resistenzentwicklung beteiligt sind, wird vermutet, dass die Akkumulation von mehreren Resistenzgenen in einem Stamm das Ergebnis einer Kombination aus Zell-zu-Zell-Transfer, spontaner Mutation und Selektion ist (Lyon *et al.*, 1987). Eine Selektion findet hauptsächlich in Krankenhäusern statt, da der Gebrauch von Antibiotika hier weit verbreitet ist. In diesem Zusammenhang muss besonders auf multiresistente koagulasengative Staphylokokken hingewiesen werden, die die Haut kolonisieren und in der Lage sind, sensible Stämme zu verdrängen (Archer *et al.*, 1983). Sie liefern ein breites Spektrum an Resistenzgenen, die unter Staphylokokken aller Spezies verbreitet werden können (Archer *et al.*, 1988). Dabei werden durch Konjugation Plasmide von einer Zelle auf die nächste übertragen. Auf diesen Plasmiden befinden sich verschiedene Transposons, die unterschiedliche Resistenzgene beinhalten können. Transposon 554 beispielsweise ist auf dem gleichen genetischen Element wie mecA, der mec-Determinante lokalisiert. Dies ist ein großes heterologes chromosomales Insert, das neben dem mec-A-Gen und Tn554 die Insertionsstelle IS1257 trägt. IS1257 befindet sich in der sogenannten Hypervariablen Region und dient als Integrationsstelle für weitere Resistenzdeterminanten (Bech *et al.*, 1986; Gillespie *et al.*, 1987).

c) Pathogenitätsfaktoren

Im folgenden wird auf die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* eingegangen.

- Plasmakoagulase

  Es handelt sich um ein extrazelluläres Enzym mit Thrombinfunktion, es dient der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Dies geschieht durch Bindung des Enzyms an das humane Prothrombin im Plasma. Außerdem existiert noch eine zellwandgebundene Koagulase, der sogenannte „Clumping factor“, der ebenfalls an Fibrinogen bindet und es in Fibrin umwandelt. Dieser Pathomechanismus trägt ganz wesentlich zur Bildung von Furunkeln bei (Foster *et al.,* 1988).

- Kapselpolysaccharide

  Es existieren elf verschiedene Kapselpolysaccharide, die die Phagozytose erschweren (Anthony *et al.,* 1988). Die Fähigkeit zur Bildung von Kapselpolysacchariden bleibt nur besonders virulenten *S. aureus*-Stämme vorbehalten.

- Hämolysine

  S. aureus synthetisiert vier verschiedene Hämolysine, die Toxine α, β, γ und δ, wobei aber lediglich α und δ eine wichtige pathogenetische Rolle spielen (Dinges *et al.*, 2000). Das α-Toxin ist ein hämolytisches zytotoxisches Enzym, das in der Lage ist, sowohl humane Erythrozyten als auch Endothelzellen, Liposomen, Monozyten und Keratinozyten zu zerstören (Dinges *et al.*, 2000; Bhakdi *et al.,* 1991). Das δ-Toxin besitzt die Fähigkeit, verschiedene Gewebszellen und intrazelluläre Organellen unspezifisch zu lysieren. Es zeigt jedoch nur eine geringe Affinität zu humanen Erythrozyten (Dinges *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1997).

- Leukocidin

  Leukocidine führen zur Degranulation von Mikrophagen und Makrophagen (Dinges *et al.*, 2000).

- Protein A

  Es bindet an den Fc-Teil von Immunglobulin G (IgG) und man vermutet, dass dadurch die Bindung an opsonierende Antikörper verhindert und die Phagozytose erschwert wird (Anthony *et al.*, 1988).

- Superantigene

  Es handelt sich um Produkte von Bakterien und Viren, die in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen in der Lage sind, viele verschiedene CD4+-Zellen sehr effizient zu stimulieren. Diese stimulierten T-Zellen produzieren überschießende Mengen an Zytokinen, was letztendlich zu einer Immunsuppression führt. Bei *S. aureus* existieren als Superantigene die Enterotoxine A-E, das TSST 1 und das Exfoliativtoxin (Dinges *et al.,* 2000; McCormick *et al.,* 2001). Die fünf serologisch unterscheidbaren Enterotoxine stellen die Auslöser der Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung dar, das Exfoliativtoxin verursacht eine Epidermolyse (Dinges *et al.,* 2000) und das TSST 1 ist für das Toxischer-Schock-Syndrom verantwortlich, indem es die Synthese von Interleukin 1, Tumor-Nekrose-Faktor β und Interferon γ anregt (Betley *et al.,* 1992). Die Enterotoxine und TSST können in einem Stamm allein oder kombiniert vorkommen, manche Kombinationen, wie TSST 1 und Enterotoxin C, kommen jedoch häufiger vor (McCormick *et al.,* 2001; Dinges *et al.,* 2000; Betley *et al.,* 1992).

1.3.2 Streptokokken

a) Morphologie und klinische Bedeutung

Es handelt sich um unbewegliche, katalasenegative, fakultativ anaerobe Bakterien. Die Einteilung erfolgt aufgrund ihres Hämolysevermögens (α-, β-, γ-Hämolyse) sowie der Antigenität eines in der Zellwand vorkommenden Kohlenhydrats (Lancefield-Antigen) (Kayser, 1997).

Streptococcus pneumoniae **(Pneumokokken)** sind ovale bis lanzettförmige Kokken, die meist als Pärchen oder kurze Ketten vorkommen. Um die Kolonien findet man α-Hämolyse-Zonen (Kayser, 1997). Die meisten Stämme tragen eine sie vor Phagozytose schützende Kapsel, weshalb sie als S-Form (für „smooth“) bezeichnet werden. Es sind mehr als 80 verschiedene Kapsel-Serotypen bekannt (Garcia *et al.,* 1997). Unbekapselte Stämme deklariert man als R-Form (für „rough“), diese sind nicht virulent (Austrian, 1981). Die Optochin-Sensitivität der Pneumokokken dient zur Abgrenzung gegenüber anderen α-Streptokokken (Kayser, 1997).

Immunsupprimierte und ältere Menschen sind besonders von Erkrankungrn durch Pneumokokken bedroht, es existiert aber eine aktive Schutzimpfung. Der Impfstoff enthält die aufgereinigten Kapselpolysaccharide (Obaro, 2002; Jedrzejas, 2001).

Pneumokokken kommen physiologisch bei 40-70% der gesunden Erwachsenen in der Schleimhaut des Respirationstraktes vor und Infektionen gehen in der Regel von der eigenen Flora aus (endogene Infektionen). Dabei stellen kardiopulmonale Grundleiden, vorausgegangene Infektionen (z.B. Influenza), Milzexstirpation und Komplementdefekte prädisponierende Faktoren dar. Die wichtigsten Krankheitsbilder sind die Lobärpneumonie und die Bronchopneumonie (Kayser, 1997). Außerdem sind Pneumokokken die häufigsten Erreger der eitrigen Meningitis, die bei Kindern als Komplikation einer Otitis media auftreten kann (Faden, 2001). Desweiteren sind die akute Exazerbation bei der chronischen Bronchitis, der Lungenabszess, das Pleura-Empyem, die Perikarditis, die Endokarditis und und das Ulcus corneae zu nennen. Im Rahmen einer direkten Ausbreitung vom Nasopharynx aus kann eine Otitis media, eine Sinusitis oder eine Mastoiditis entstehen (Jain *et al.,* 2001; Faden, 2001). Schwere Pneumokokkeninfekte gehen häufig mit einer Sepsis einher. Der Keim wird außerdem als Erreger einer Konjunktivitis bei Neugeborenen und Kleinkindern gefunden, die bei fulminantem Verlauf zur Erblindung führen kann (Austrian, 1981). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Streptococcus pneumoniae* einer der häufigsten Krankheitserreger beim Menschen ist (Holm, 1982). In den letzten Jahrzehnten hat die Resistenz gegenüber Penicillin G und anderen Antibiotika weltweit deutlich zugenommen (Tomasz, 1997). Zusätzlich zum vermehrten Auftreten von Resistenzen gegen β-Laktam-Antibiotika werden zunehmend häufig Isolate mit

einer Resistenz gegenüber Chinolonen und Makroliden, einzeln oder in Kombination beobachtet. Die Resistenz gegenüber β-Laktam-Antibiotika wird durch veränderte Penicillin-Bindende-Proteine (PBP) verursacht. Dies sind essentielle membrangebundene Enzyme, die an späteren Schritten der Mureinbiosynthese beteiligt sind. Hohe Resistenzen, wie sie in klinischen Isolaten beobachtet werden können, sind das Resultat von mehreren komplexen Veränderungen, die nicht nur ein sondern mehrere PBP betreffen (Hagenbeck, 1998). Eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von Resistenzdeterminanten spielt bei *Streptococcus pneumoniae* die Transformation. Hierbei wird freie, lösliche DNA aus einem Spenderbakterium freigesetzt und von einem Empfängerbakterium aufgenommen.

***Streptococcus pyogenes* (A-Streptokokken)** sind Kettenkokken mit einem Durchmesser von 1 µm. Nach Kultivierung sieht man kleine, grau-weißliche Kolonien. Sie sind von einer großen β-Hämolysezone umgeben, die durch Streptolysine verursacht werden.

Neben Scharlach verursachen *S. pyogenes* invasive lokale Infekte, wie Erysipele, die sich bei schlechter Abwehrlage des Wirts massiv im Gewebe ausbreiten können. Dies kann dann zur nekrotisierenden Fasciitis, zur Sepsis oder zur schwersten Komplikation, dem septischen Schock führen.

Folgekrankheiten einer Infektion mit A-Streptokokken können die Glomerulonephritis oder das akute rheumatische Fieber sein.

Orale Streptokokken werden oft auch als ***Viridans*-Gruppe** bezeichnet und existieren in der Mundhöhle. Sie verursachen meist α-, manche auch γ-Hämolyse. Sie sind für 50- 70% aller bakteriellen Endokarditiden verantwortlich. Außerdem werden sie zu den auslösenden Faktoren bei Zahnplaque und Karies gerechnet (Kayser, 1997).

b) Pathogenitätsfaktoren von Pneumokokken

Die Pathogenitätsfaktoren von Pneumokokken sind noch nicht in dem Maße erforscht, wie es bei Staphylokokken der Fall ist (Mitchell, 2000). Einige wichtige Faktoren sind jedoch bereits bekannt:

- Kapselpolysaccharide

  Es kommt zu einer Maskierung von gebundenen Komplementfaktoren, die dadurch von den entsprechenden Rezeptoren auf den Makrophagen nicht mehr erkannt werden. Die Opsonierung und somit auch die Phagozytose wird dadurch verhindert (Garcia *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1995). Schwerwiegende Erkrankungen durch Pneumokokken werden durch die Kapseltypen ausgelöst, die kein Komplement aktivieren, denn so können sie der komplementvermittelten Phagozytose entgehen. Dies ist in besonderem Maße von Nach-

teil, bevor sich Antikörper bilden, also in der Frühphase von Infektionen (Tuomanen, 1999).

- IgA1-Protease

  Durch den Abbau von IgA-Antikörpern unterstützt diese Protease die Etablierung der Bakterienzelle auf der Schleimhaut.

- Pneumolysin

  Dies ist ein intrazelluläres Hämolysin, was bei der Autolyse von Zellen freigesetzt wird. Es lagert sich an das Cholesterol von Zellmembranen an und führt letztendlich zur Bildung einer transmembranösen Pore, was ein Absterben der Zelle nach sich zieht (Jedrzejas, 2001). In sublytischen Konzentrationen hemmt Pneumolysin die Funktion von Phagozyten und Lymphozyten. Desweiteren aktiviert Pneumolysin das Komplement, indem es an die Fc-Region von IgG bindet, es ist in der Lage, aus Monozyten IL-1β und TNF-α freizusetzen. Außerdem kann es zilientragende Epithelzellen zerstören und so die Infektionsschranke im oberen Respirationstrakt aufheben (Watson *et al.,* 1995; Mitchell, 2000).

- Neuraminidasen

  Dies sind Proteine, über die man bisher nur wenig weiß. Es ist bekannt, dass sie durch Sialinsäureabspaltung Rezeptoren freilegen können (Jedrzejas, 2001).

- psaA

  Dieses Protein vermittelt zusammen mit anderen unzureichend beschriebenen Oberflächenmolekülen die Bindung der Bakterienzelle an Glykokonjugatrezeptoren auf den Epithelzellen.

- C-Substanz

  Dies ist ein Antigen, welches aus in der Zellwand verankerten Teichonsäuren besteht. Leidet ein Patient an einer akuten Entzündung, wird ein β-Globulin produziert, welches die C-Substanz der Pneumokokken ausfällt. Man nennt dieses β-Globulin auch C-reaktives Protein (CRP). Es wird in der Leber nach Stimulation durch Interleukin-1 gebildet (Mitchell, 2000).

1.3.3 Enterobakterien

a) Morphologie und klinische Bedeutung

Die für die Humanmedizin wichtigste Bakterienfamilie ist die der *Enterobacteriaceae.* Man unterscheidet Gattungen und Arten, die spezielle, mit typischer klinischer Symptomatik einhergehende Krankheitsbilder verursachen, sowie zahlreiche Opportunisten, die vor allem no-

sokomiale Infektionen, wie z.B. Harnwegsinfekte, Pneumonien, Wundinfekte und Sepsen hervorrufen.
Generell sind *Enterobacteriaceae* gramnegative, häufig bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Ihre große Stoffwechselaktivität kann zu ihrer Identifizierung hilfreich sein. Außerdem ist es möglich, sie aufgrund von O-, H- und K-Antigenen in Arten und Serovare zu unterteilen, was epidemiologisch bedeutsam ist.
Enterobacteriaceae sind die wichtigsten Mikroorganismen im Hinblick auf die Auslösung von intestinalen Infektionen, die in der Bevölkerung der Dritten Welt zu den häufigsten Krankheiten überhaupt zählen. Sie stellen hier die häufigste Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren dar (Mortalität ca. 50/1000/Jahr).
Klinisch unterteilt man Infektionen mit diesen Keimen in nicht-entzündliche und entzündliche Enteritiden sowie in Systemmanifesationen enteraler Infekte.

b) Pathogenitätsfaktoren

Zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren zählen die Kolonisationsfaktoren, die Invasine, das Endotoxin sowie verschiedene Exotoxine.
Im folgenden soll nun näher auf die opportunistischen *Enterobacteriaceae* eingegangen werden, da sie auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.
Die opportunistischen *Enterobacteriaceae* weisen nur ein geringes pathogenes Potential auf. Die häufigsten Infekte, die sie verursachen, sind: Harnwegsinfekte, Infekte des Respirationstraktes, Wundinfekte, Infekte der Haut und der Subkutis und Sepsen.
Diese Erkrankungen können nur bei bestimmter Disposition des Wirts entstehen, wie z.B. bei hospitalisierten Patienten mit schwerem Grundleiden. So führt *K. pneumoniae* bei Vorliegen einer chronischen Lungenerkrankung zur Friedländer-Pneumonie (Kayser, 1997). Ein weiterer Grund für die Relevanz der opportunistischen *Enterobacteriaceae* in der Krankenhausmedizin liegt im häufigen Vorkommen von Resistenzen gegen Antiinfektiva bei diesen Keimen (Kayser, 1997).

Escherichia coli

Die gramnegativen, geraden Stäbchen sind peritrich begeißelt. Sie sind in der Lage, Laktose zu verstoffwechseln. Die komplexe Antigenstruktur basiert auf O- und H-Antigenen. Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Aus diesem Grund gilt er auch als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen von Wasser und Lebensmitteln. *E. coli* ist der häufigste Erreger bakterieller Infektionen beim Menschen. Zu den extraintestinalen Infekten zählen die Harnwegsinfekte, Cholezystitis, Appendizitis, Peritonitis, postoperati-

ve Wundinfekte und Sepsen. Intestinale Infekte werden durch die Pathovare *EPEC, ETEC, EIEC* und *EHEC* verursacht. *EPEC (=enteropathogene E. coli)* sind für die heute seltene Säuglingsdiarrhö verantwortlich. *ETEC (=enterotoxische E. coli)* verursachen aufgrund der Produktion von Enterotoxinen ein choleraähnliches Krankheitsbild. Die *EIEC (=enteroinvasive E. coli)* lösen eine ruhrähnliche Infektion des Dickdarms aus. Die *EHEC (=enterohämorrhagischen E. coli)* produzieren die Vero-Zytotoxine und bedingen eine hämorrhagische Kolitis sowie das hämolytische Urämiesyndrom (Kayser, 1997).

Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca

Die gramnegativen Stäbchen bauen Laktose ab und sind unbeweglich. Viele Stämme besitzen eine Polysaccharidkapsel. Klebsiellen verursachen ca. 10% aller nosokomialen Infektionen. Vor allem bei Vorliegen chronischer Lungenerkrankungen können sie Erreger der sogenannten „Friedländer-Pneumonie" sein (Kayser, 1997)

Enterobacter cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans* und *E. sakazakii

Es handelt sich um gramnegative bewegliche Stäbchen, die Laktose abbauen und häufig Mehrfachresistenzen aufweisen (Kayser, 1997).

1.4 Entwicklung der Chinolon-Antibiotika

Zur Therapie bakterieller Infektionen werden Antibiotika eingesetzt, dies sind niedermolekulare Stoffe mit einer antibakteriellen Wirkung. Zu diesen zählt man auch die Chinolone und abgeleitete Derivate (Naphthyridone), bei denen es sich, anders als bei den meisten Substanzklassen, um synthetische Verbindungen handelt. Die Bezeichnung dieser Chemotherapeutika-Gruppe ist uneinheitlich. Sie werden z. T. als Chinolone (englisch `Quinolones´) oder Fluorochinolone bezeichnet. Da jedoch nicht alle Substanzen Chinolin-Derivate sind, erscheint die Gruppenbezeichnung „Gyrase-Hemmer" genauer, denn alle Verbindungen hemmen die bakteriellen DNS-Topoisomerasen (oder Gyrasen), welche zur Nukleinsäure-Synthese benötigt werden (Rosin, 1996).

Der erste Vertreter der neuen Antibiotikaklasse der Chinoloncarbonsäuren, die Nalidixinsäure, entstand als Nebenprodukt bei der Herstellung des Malariamittels Chloroquin. Die Nalidixinsäure (Nogram®) zeigte eine gute bakterizide Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Enterobakterien und wurde zur Behandlung von akuten und chronischen Harnwegsinfektionen 1962 in Deutschland eingeführt (Lesher, 1962). Allerdings begrenzte das enge Spektrum der erfassten Erreger, die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften (orale Verfügbarkeit, jedoch ohne ausreichende Gewebegängigkeit) sowie das rasche Auftreten resistenter Stämme

den therapeutischen Einsatz der Substanz. Mit Cinoxacin (Cinobactin®), Oxolinsäure (Nidantin®) und Pipemidsäure (Deblaston®) folgten bald Analogpräparate mit ähnlichem Wirkungsprofil, sie erlangten jedoch nur wenig oder eine etwa gleichwertige klinische Bedeutung (Rosin, 1996). Die Pipemidsäure entstand durch die Einführung eines Piperazinrestes in Position C7, nun konnte das Wirkungsspektrum auf *Pseudomonas aeroginosa* ausgedehnt werden (Shimizu, 1988). Die Weiterentwicklung der Chinolonantibiotika, deren entscheidender Schritt die Einführung eines Fluoratoms an C6 darstellte, führte 1982 zu neuen Substanzen, die über ein breiteres Wirkungsspektrum und eine bessere Pharmakokinetik verfügten. Norfloxacin (Barazan®,1978) bildete die Ausgangssubstanz der modernen 4-Chinolone, die nun auch als Fluorochinolone bezeichnet wurden. Weitere Substanzen wie Ofloxacin (Tarivid®, 1985), Ciprofloxacin (Ciprobay®, 1987), Sparfloxacin (1996), Grepafloxacin (1997), Trovafloxacin (1998), Levofloxacin (1998), Moxifloxacin (2000) und Gatifloxacin (2001) kamen in den folgenden Jahren in Deutschland in den Handel (Wiedemann, 1999).
Eine neue Gruppe, der hier besondere Beachtung geschenkt werden soll, stellen die Des-F6-Fluorchinolone dar, von denen man sich eine bessere Verträglichkeit bei guter In-vitro-Aktivität erhofft. BMS-284756 ist eines dieser neuen Des-F6-Fluorchinolone, das eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien besitzt (Fung-Tomc *et al.*, 2000).

1.5 Einteilung der Chinolone

Die verschiedenen Vertreter der Klasse der Chinolone ähneln sich zwar in ihrem Wirkmechanismus, sie unterscheiden sich jedoch in ihrem antibakteriellen Spektrum, ihren pharmakokinetischen Eigenschaften, ihrer klinischen Wirksamkeit und ihren Indikationen. Auch die Verträglichkeit und die Interaktion mit anderen Substanzen variieren.
Während der Behandlung mit den bereits länger bekannten Fluorchinolonen treten unerwünschte Nebenwirkungen bei etwa 4-10% der Patienten auf. Am häufigsten manifestieren sich diese am Magen-Darm-Trakt, als ZNS- oder als Hautreaktionen. Desweiteren wurden Entzündungen und Rupturen von Sehnen beschrieben. Außerdem ist zu beachten, dass Milch oder Milchprodukte, Eisenpräparate, Arzneimittel, die Calcium-, Magnesium- oder Aluminiumsalze enthalten sowie Colestyramin in einem ausreichenden zeitlichen Abstand eingenommen werden, um die Resorption der Chinolone nicht zu beeinträchtigen. Um dem Arzt die richtige Auswahl eines Chinolons für bestimmte Infektionen zu erleichtern, wurde 1998 von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft eine Einteilung geschaffen. Zwischen den aufgeführten

Gruppen bestehen fließende Übergänge, dies wird besonders deutlich an dem Beispiel von Levofloxacin und Ofloxacin.

Gruppe 1: Dies sind orale Fluorchinolone **(Norfloxacin, Pefloxacin[1])**, deren Wirkungsspektrum hauptsächlich *Enterobacteriaceae* umfasst, mit im wesentlichen auf Harnwegsinfektionen eingeschränkter Indikation. Sie stehen zur *parE*nteralen Gabe nicht zur Verfügung. Darüber hinaus kann Norfloxacin zur Behandlung der bakteriellen Enteritis, Gonorrhö und Prostatitis eingesetzt werden.

Gruppe 2: Sie beinhaltet Fluorchinolone zur systemischen Anwendung mit breiter Indikation **(Enoxacin, Fleroxacin*, Ofloxacin, Ciprofloxacin)**. Sie weisen eine gute Wirksamkeit gegen *Haemophilus influenzae* und eine schwächere Wirkung gegen Staphylokokken, Pneumokokken und Enterokokken sowie gegen die atypischen Erreger Chlamydien, Legionellen und Mykoplasmen auf. Die Aktivität gegen *Pseudomonas aeroginosa* ist uneinheitlich, wobei Ciprofloxacin am effektivsten ist. Neben Ciprofloxacin sind aus dieser Gruppe noch Ofloxacin und Fleroxacin parenteral einsetzbar. Das Indikationsspektrum umfasst neben Harnwegsinfektionen auch Infektionen der Atemwege, insbesondere, wenn diese durch gram-negative Errger hervorgerufen wurden, sowie Haut-, Weichteil- und Knocheninfektionen und systemische Infektionen bis hin zur Sepsis.

Gruppe 3: Dies sind Fluorchinolone mit höherer intrinsischer Aktivität gegen grampositive Erreger wie Staphylokokken, Streptokokken und Pneumokokken bei weitgehend vergleichbarer Aktivität gegen gramnegative Erreger **(Levofloxa-cin, Sparfloxacin*, Grepafloxacin*)**. Hinzu kommt eine bessere Wirksamkeit gegen die sogenannten „atypischen" Erreger Chlamydien, Legionellen und Mykoplasmen. Einziges parenterales Fluorchinolon ist hier das Levofloxacin (Tavanic®), das linksdrehende Enantiomer des Razemats Ofloxacin. Die Gruppenzuweisung des Levofloxacins ist umstritten, da es der antibakteriell wirksame Anteil des Ofloxacins aus Gruppe 2 ist. Haupteinsatzgebiete des Levofloxacins sind Atemwegsinfektionen, Harnwegs-infektionen wegen der hohen renalen Eliminationsrate sowie Haut- und Weichteilinfektionen.

[1] Diese Substanzen sind im Handel in Deutschland nicht erhältlich.

Gruppe 4: Fluorchinolone dieser Gruppe **(Moxifloxacin, Gemifloxacin[2], Gatifloxacin, Trovafloxacin*, Clinafloxacin*)** besitzen alle Eigenschaften der Gruppe 3, außerdem zeigen sie eine verbesserte Aktivität gegen Anaerobier. Derzeit im Handel befindet sich lediglich Moxifloxacin und Gatifloxacin, nachdem Trovafloxacin von der europäischen Zulassungsbehöre EMEA im Sommer 1999 wegen hepatischer Unverträglichkeitsreaktionen vom Markt genommen werden musste. Es kann für die Substanzen dieser Gruppe noch nicht abschließend beruteilt werden, inwieweit Indikationen wie z.B. Haut-, Weichteil-, Knocheninfektionen, abdominale Infektionen oder systemische Infektionen bis hin zur Sepsis und Meningitis als Einsatzgebiete in Frage kommen werden.

Neben der Therapie von Atemwegsinfektionen sind die oben genannten Breitspektrum-Fluorchinolone wahrscheinlich auch zur Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen, intraabdominellen sowie gynäkologisch/urologischen Infektionen geeignet. Die neueren Fluorchinolone der Gruppe 4 stellen vom Wirkungsspektrum her insbesondere eine Bereicherung des Therapierepertoires bei ambulant erworbenen Atemwegsinfektionen dar. Die häufigsten Erreger ambulant erworbener Pneumonien sind bekanntlich *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus spp.* und *Moraxella catarrhalis*. Bisherige klinische Studien zeigen durchschnittliche Heilungsraten von 80-90% bei ambulant erworbener Pneumonie unterschiedlichen Schweregrades und gleichwertige bis bessere klinische Behandlungsergebnisse gegenüber den Vergleichssubstanzen. Außerdem zeichnet sich bei schweren Infektionen die Möglichkeit der Monotherapie im Vergleich zur sonst erforderlichen Kombinationstherapie ab. Vorteile gegenüber etablierten Therapieprotokollen ergeben sich besonders häufig bei Infektionen, die mit dem Risiko eines komplizierten Verlaufs behaftet sind.
Für die definitive Einordnung der Substanzgruppe der Fluorchinolone innerhalb des therapeutischen Spektrums und für eine vergleichende Bewertung der einzelnen Substanzen sind jedoch noch umfangreichere klinische Tests, insbesondere bei Problemkollektiven, erforderlich.
Neuere Fluorchinolone befinden sich in ständiger Entwicklung, dazu zählen beispielsweise Lomefloxacin, Fleroxacin, Tosufloxacin, Sparfloxacin, Prulifloxacin und Pazufloxacin für die intravenöse Anwendung (Takahashi *et al.,* 2003). Wechselwirkungen mit anderen Substnazen sowie zahlreiche unerwartete Nebenwirkungen dieser neuen Fluorchinolone wie Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem, Phototoxizität, Hepatotoxizität, Kardiotoxizität sowie

[2] Diese Substanzen sind im Handel in Deutschland nicht erhältlich.

eine Verlängerung des QT-Intervalls machen eine sorgfältige Evaluation unabdingbar (Takahashi *et al.*, 2003).

1.6 Chemie und Struktur-Wirkungsbeziehung

Die Chinolonantibiotika enthalten als Grundgerüst das Chinolin, das Naphtyridin, das Pyridopyrimidin und das Cinnolin. Der mit Abstand am häufigsten vorkommende Grundkörper ist das Chinolin, aus dem sich die 4-Oxochinoloncarbonsäuren herleiten.

Man nimmt an, dass die Oxo-Gruppierung an C4 und die Carbonsäure an C3 an den Interaktionen mit den zellulären Zielstrukturen, den Typ II Topoisomerasen, beteiligt sind. Diese Substituenten sind in der Lage, mit verschiedenen Ionen wie z.B. Mg2+ Chelatkomplexe zu bilden. Dies ist sowohl essentiell für die Wechselwirkung mit dem Topoisomerase-DNS-Komplex, als auch ein wichtiger Faktor, der zur Membrangängigkeit der Substanzen beiträgt. Denn durch die Chelatkomplexbildung mit den Mg2+-Ionen aus der Lipopolysaccharidschicht der Epithelien werden diese Ionen aus der Membran herausgelöst und es entstehen hydrophobe Bereiche, durch die die unkomplexierten Chinolonmoleküle hindurchtreten können (Heisig, 1997).

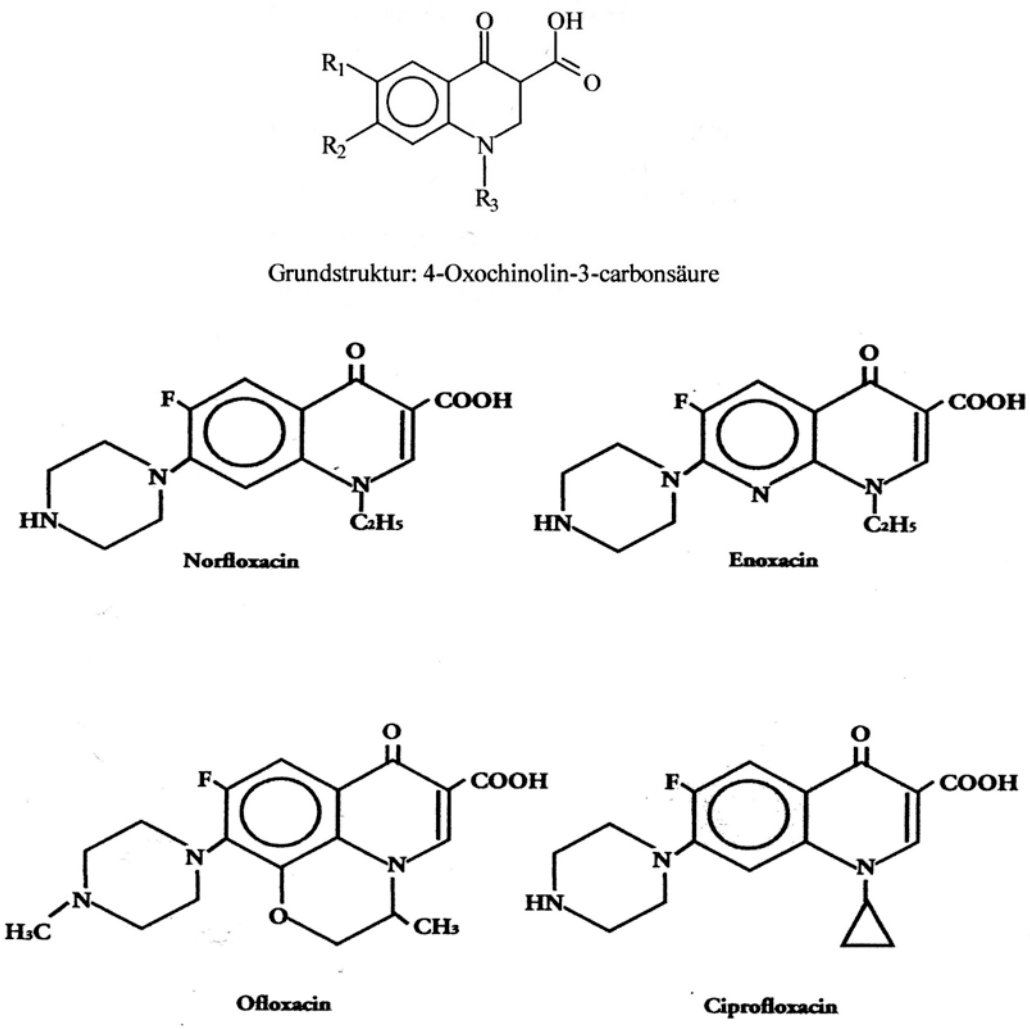
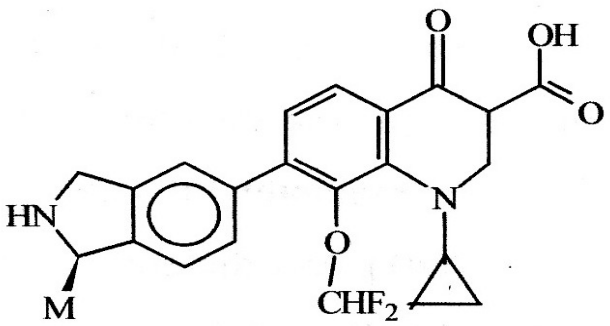


Abbildung 1: Strukturformeln der 4-Oxochinolin-3-Carbonsäure und verschiedener Chinolone

1.7 BMS-284756

Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen stellen bei Staphylokokken ein weit verbreitetes Problem dar. Aufgrund der eingeschränkten Verwendbarkeit von Ciprofloxacin und anderen älteren Fluorchinolonen zur Behandlung von durch *S. aureus* verursachten Krankheitsbildern besteht der dringende Bedarf zur Entwicklung neuer Chinolone mit gesteigerter Wirksamkeit. Ein Fluoratom an C6 erhöht im allgemeinen die antibakterielle Aktivität um das 5 – 100fache. Jedoch wurden in letzter Zeit verschiedene neue Des-Fluorchinolone erprobt, die eine hervorragende In-vitro-Aktivität zeigen (Fung-Tomc *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2001; Roychudhury *et al.*, 2001). BMS-284756 ist solch ein neues Chinolon und verfügt über ein breites Spektrum antibakterieller Aktivität. BMS besitzt im Gegensatz zu den bis jetzt gebräuchlichen Substanzen keinen Fluor-Liganden am C6-Atom. In Abbildung 2 ist die genaue Struktur von BMS dargestellt.



BMS-284756

Abbildung 2: Strukturformel von BMS-284756

Auch bei der Therapie von Pneumokokkeninfektionen wäre BMS als alternatives Präparat denkbar. Zur Zeit wird zum größten Teil mit β-Laktam-Antibiotika behandelt, jedoch hat sich in den letzten Jahren eine zunehmende β-Laktam-Resistenz und damit einhergehend eine Multiresistenz entwickelt. Außerdem nimmt auch die Zahl der Fluorchinolon-resistenten Pneumokokken zu (Tomasz, 1997).

BMS-284756 verfügt über ein breites Spektrum antibakterieller Aktivität sowohl im gramnegativen und grampositiven Bereich als auch im aeroben und anaeroben Bereich. Dies schließt auch Stämme mit erhöhten MHK-Werten gegenüber Ciprofloxacin ein (Fung-Tomc *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2001; Takahata *et al.*. 1999). Es stellt möglicherweise eine sinnvolle therapeutische Option zur Behandlung von durch Enterobakterien hervorgerufenen Infektionen dar.

1.8 Wirkungsmechanismus der Chinolone

Fluorchinolone wirken bakterizid, genauer gesagt hemmen sie die DNA- und beeinflussen die m-RNA-Synthese in der Bakterienzelle und stören so die Zellteilung und das Zellwachstum (Anderson *et al.,*1998; Drlica *et al.*, 1997; Marians *et. al.*, 1997). Die bakteriellen Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV stellen die Zielstrukturen der Chinolonantibiotika dar, sie kommen nicht nur in Bakterien, sondern auch in höheren Organismen vor. Beide Enzyme gehören zu der Familie der Topoisomerasen und sind verantwortlich für die räumliche Anordnung der Nukleinsäuren in der Zelle (Chen *et al.*, 1996; Heisig, 1997; Khodursky *et al.*, 1998; Perichon *et al.*,1997). Topoisomerasen können als „reversible Nukleasen“ angesehen werden, die zeitweise kovalent an eine Phosphatgruppe der DNA binden und so eine Phosphodiesterbindung in der DNA-Kette spalten (Alberts *et al.*, 1990). Weil die Energie der aufgetrennten Phosphodiesterbindung in der kovalenten Bindung zwischen Topoisomerase

und DNA gespeichert bleibt, spricht man auch von einer reversiblen Spaltung. Folglich kann der DNA-Strang ohne zusätzliche Energiezufuhr rasch wieder geschlossen werden.
Man differenziert bei den Topoisomerasen Typ I und Typ II. Die Typ I Topoisomerasen führen einen Einzelstrangbruch (sog. nick) herbei, so dass die DNA-Stränge an dieser Stelle frei gegeneinander rotieren können. Die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV gehören zu der Familie der Topoisomerasen Typ II. Diese führen zu einem vorübergehenden Doppelstrangbruch, indem das Enzym mit beiden Strängen der DNA-Helix gleichzeitig eine kovalente Bindung eingeht. Die Topoisomerase Typ II heftet sich an die Kreuzungsstelle zweier Doppelhelices und schneidet eine der beiden vorübergehend durch, so dass ein „Durchgang" entsteht, den die zweite in der Nähe befindliche Doppelhelix passieren kann. Am Ende schließt sich der Bruch wieder und löst sich von der DNA ab. Durch diesen Mechanismus ist es möglich, zwei wie Kettenglieder verbundene DNA-Ringe voneinander zu trennen. Bei der DNA-Replikation ist dieser Vorgang von außerordentlicher Wichtigkeit, da es sonst zu einer Verknäuelung der DNA-Enden kommen würde.

1.8.1 DNA-Gyrase

Die wichtigste Aufgabe der DNA-Gyrase besteht darin, ein ringförmiges geschlossenes DNA-Molekül (z.B. das bakterielle Chromosom oder bakterielle Plasmide) aus einem energiearmen relaxierten Zustand unter Verbrauch von ATP in einen energiereicheren negativ überspiralisierten Zustand („negatives supercoiling) zu überführen (Gellert *et al.,* 1976; Gellert *et al.*, 1983; Reece, 1991; Wiedemann, 1990). Als Voraussetzung dafür ist sie in der Lage, vorübergehende Doppelstrangbrüche in die DNA einzuführen und das Durchtreten eines DNA-Strangs durch die gebildete Lücke zu ermöglichen. Durch diesen Vorgang wird die bakterielle DNA in Schleifen gefaltet und spiralig verdrillt, so dass sie in das relativ kleine Volumen der Bakterienzelle passt (Gellert *et al.*, 1976; Gellert *et al.*, 1983; Reece, 1991; Wiedemann, 1990; Rosin, 1996). Dies bietet zum einen eine Lösung des Platzproblems, außerdem wird energetisch eine schnelle Synthese, Replikation, Transkription und Rekombination der DNA begünstigt. Die Gyrase ist ein Tetramer und besteht aus je zwei A- und B-Untereinheiten (Chen *et al.*, 1996). Die *GyrA*-Untereinheiten sind vor allem für die Wechselwirkungen mit der DNA verantwortlich, indem sie mit ihrem carboxyterminalen Ende an diese binden. Der Prozess der negativen Überspiralisierung verläuft unter dem Verbrauch von ATP, welches an die *gyrB*-Untereinheit bindet. Die Gene *gyrA* und *gyrB* kodieren die beiden Untereinheiten der Gyrase (Gellert *et al.,* 1976; Maxwell, 1986; Pan *et al.,* 1998; Zechiederich *et al.,* 1997).

Die Gyrase ist außerdem in der Lage, ATP-unabhängig eine Aufhebung des überspiralisierten Zustandes zu bewirken. Die vorhandene ATP-Menge ist letztendlich der limitierende Faktor für das Verhältnis aus Überspiralisierung und Entspannung. Da die ATP-Produktion von extrazellulären Faktoren abhängt, reagiert die Gyrase in ihrer Funktion auf Umwelteinflüsse wie Salzkonzentration und den Sauerstoffpartialdruck (Drlica *et al.,* 1997). Die Temperatur und der pH-Wert beeinflussen ebenfalls die Aktivität, es ist jedoch noch unklar, ob dies ATP-abhängig geschieht. Außerdem kann das Ausmaß der Überspiralisierung durch Gyraseinhibitoren beeinflusst werden, vor allem bei einem Mangel an Topoisomerase I. Dieses Enzym verhindert die Anhäufung von zu vielen Überwindungen. Wenn der Grad der Überspiralisierung abnimmt, steigert sich die *gyr*-Expression (Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997). Weitere Aufgaben der Gyrase sind die Entfernung von Knoten in der DNA und die Faltung der DNA-Stränge.

In Abbildung 3 a) - c) ist die Bildung von „Über-Helices“ und deren Asuwirkung auf die räumliche Anordnung der DNA dargestellt.

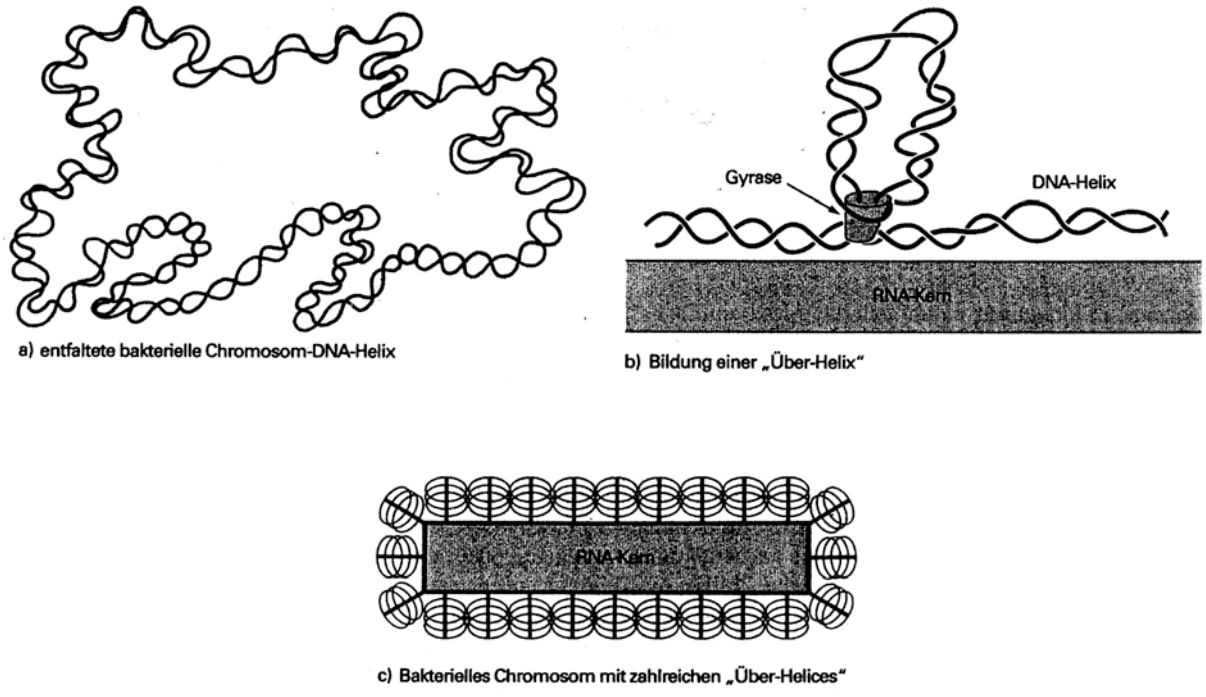


Abbildung 3: a) Entfaltetes bakterielles Chromosom ohne „Über-Helices“
b) Gyrase bildet „Über-Helix“
c) Durch „Über-Helices“ verdichtetes bakterielles Chromosom

1.8.2 Topoisomerase IV

Wie die Gyrase ist auch die Topoisomerase IV ein Tetramer aus je zwei identischen Untereinheiten, sie wird kodiert durch die Gene *parC* und *parE* bei *Streptococcus pneumoniae, Enterococcus spp.* und *Enterobacteriaceae,* bzw. *grlA* und *grlB* bei *Staphylococcus aureus.* Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV ist die Dekatenierung. So nennt man den Prozess, bei dem die replizierten Tochtorchromosomen, die wie Kettenglieder miteinander verknüpft sind, voneinander getrennt werden (Gellert *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997). Verhindern Chinolone die Dekatenierung, kann es nicht zu einer Verteilung der Chromosomen in die beiden Tochterzellen kommen. Auch hier bilden die Chinolone mit der DNA und der Topoisomerase einen ternären Komplex, der die weitere Vermehrung der Bakterienzelle aufhält. Desweiteren wird vermutet, dass die Topoisomerase IV, ähnlich wie die Topoisomerase II in eukaryontischen Zellen, DNA-crossovers erkennt und diese entfernt. Außerdem ist die in der Lage, bei einem Defekt der Topoisomerase I deren Aufgaben zu übernehmen (Gellert *et al.*, 1976; Pan *et al.*, 1998; Zechiederich *et al.*, 1997).

1.8.3 Wirkung der Chinolone in der Zelle

Fluorchinolone hemmen die DNA-Replikation und –Transkription, indem sie mit hoher Affinität an den Enzym-DNA-Komplex binden. Es entsteht ein stabiler ternärer Komplex aus DNA, Gyrase und Chinolonen, der zum einen das Ablesen der Informationen der DNA verhindert und zum anderen auch die Vermehrung der DNA blockiert, weil die Polymerasen nicht über diesen Komplex „hinweglesen“ können. Das Wiederverschließen der Doppelstrangbrüche, die die Enzyme eingeführt haben, wird unmöglich. Ein Zusammentreffen eines solchen Gyrase-Chinolon-DNA-Komplexe mit einer Replikationsgabel im Laufe des Replikationsvorgangs führt zu einer irreversiblen Fixierung des Komplexes. Die letale Wirkung entsteht, wenn durch Ablösung des Enzyms von der DNA oder durch Aufspaltung der Topoisomerasen in ihre Untereinheiten freie DNA-Enden freigesetzt werden (Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997; Hiasa *et al.*, 1996; Kampranis, 1998). So werden Stressreaktionen hervorgerufen, die letztendlich zum Absterben der Zelle führen (Philips *et al.,* 1987, Yoshida *et al.*, 1990).

In Abbildung 4 erfolgt die grafische Darstellung des Chinolon-DNA-Bindungsmodells.

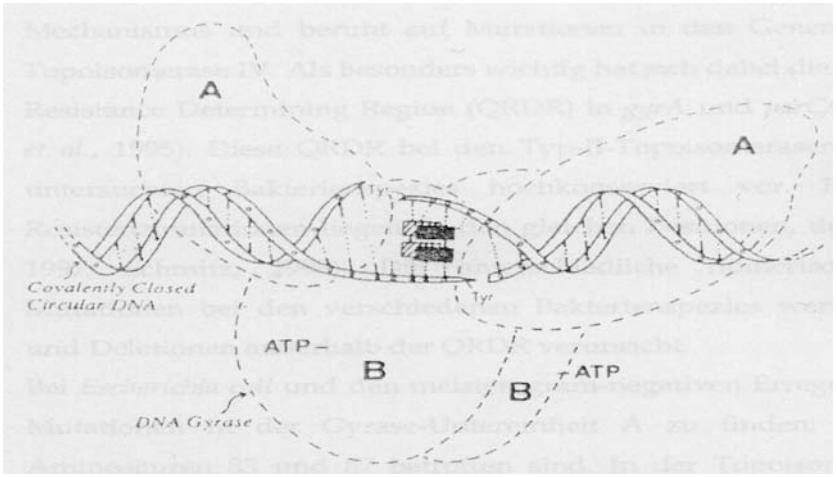


Abbildung 4: Chinolon-DNA-Bindungsmodell von Shen *et al.* (1989). Eine Darstellung der Chinolonmoleküle innerhalb einer Gyrase-induzierten Einzelstrang-DNA-Bindungsstelle erfolgt durch die schwarzen und schraffierten Rechtecke.

Die Gyrase und die Topoisomerase IV können als letale Zielstrukturen bezeichnet werden, daneben existieren noch nichtletale Zielstrukturen, mit denen die Chinolonantibiotika interagieren. Dazu zählt man beispielsweise Effluxproteine, die sowohl im gramnegativen als auch im grampositiven Bereich vorkommen, sowie Bestandteile der Cytoplasmamembran ausschließlich bei gramnegativen Bakterien, sog. Porine. Durch diese wassergefüllten Poren können vor allem hydrophile Chinolone wie Ciprofloxacin leichter hindurchdiffundieren (Heisig, 1997).

Während das primäre Target der Chinolone bei gramnegativen Bakterien die Gyrase ist, stellt die Topoisomerase IV bei grampositiven Keimen die hauptsächliche Zielstruktur dar. Welcher DNA-Enzym-Komplex das empfindlichere Ziel ist und daher mit höherer Affinität von einem Chinolon gebunden wird, hängt einerseits von der chemischen Struktur des Chromosoms und andererseits von den strukturellen Eigenschaften des Enzyms einer Spezies ab.

1.9 Resistenzmechanismen

Bakterien könne Resistenzen gegenüber Antibiotika entwickeln, indem sie entweder die vorhandene genetische Information verändern (Mutation) oder neue genetische Information aufnehmen (z.B. in Form von Plasmiden mit entsprechenden Resistenzgenen), so dass die Zellen weniger empfindlich gegenüber bestimmten Substanzen werden.

Man unterscheidet grundsätzlich drei Mechanismen zur Resistenzentwicklung:

1. Veränderung der Zielstruktur im Bakterium (z.B. Modifikation in den ribosomalen Proteinen).
2. Inaktivierung der Substanz, wobei die Bakterien Enzyme produzieren, welche Antibiotika inaktivieren können (z.B. β-Laktamasen, die β-Laktam-Antibiotika hydrolytisch spalten).
3. Verringerung der Substanzkonzentration am Wirkungsort, d.h. eine geringere Menge Antibiotikum steht für die Bindung an die Zielstruktur zur Verfügung (z.B. Zellwandveränderungen, die zu einer herabgesetzten Penetration von Antibiotika in die Zelle führen oder Effluxpumpen, die Substanzen aktiv aus der Zelle herausschleusen).

Von den drei genannten Mechanismen sind für die Chinolone lediglich der erst- und letztgenannte von Bedeutung, denn es sind bisher keine bei Bakterien vorkommenden Enzyme bekannt, die diese synthetischen Substanzen inaktivieren könnten (Heisig, 1994; Schmitz *et al.*, 1998). Der wichtigste Mechanismus stellt die Resistenzvermittlung durch Veränderung der Zielstruktur dar. Dies beruht auf Mutationen in den Genen der Gyrase und der Topoisomerase IV. Von besonderer Relevanz ist dabei die sogenannte „Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) in *gyrA* und *parC/grlA* (Ferrero *et al.*, 1995). Bei den Typ-II-Topoisomerasen liegt diese QRDR bei allen bisher untersuchten Bakterienspezies hochkonserviert vor, d.h. häufig vorkommende Resistenzmutationen sind vorwiegend an den gleichen Positionen, den sogenannten „hot spots“ lokalisiert (Heisig, 1997; Schmitz *et al.*, 1998). Die unterschiedliche Bezifferung der Aminosäuren bei den verschiedenen Bakterienspezies werden durch Insertionen und Deletionen außerhalb der QRDR verursacht.

Mutationen der Gyrase-Untereinheit A findet man am häufigsten bei *E. coli* und den meisten anderen gramnegativen Erregern, wobei vor allem die Aminosäuren 83 und 87 betroffen sind. In der Topoisomerase IV-Untereinheit *parC* befinden sich die hot spots an den Positionen 80 und 84. Die resistenzvermittelnde Mutation in den Genen *gyrA* bzw. *parC/grlA* bedingen einen Aminosäureaustausch in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms (Tyr 122 in *E. coli*), welcher eine geringere Affinität zu Chinolonen nach sich zieht. Dagegen führen Mutationen in *gyrB/parE/grlB* meist nur zu einer gemäßigten Resistenzerhöhung gegenüber Chinolonantibiotika, die im klinischen Alltag nicht relevant sind (Heisig, 1997 und 1994; Schmitz *et al.*, 1998; Wiedemann *et al.*, 1999; Witte, 1998).

Bei Betrachtung der Mutationsfolge ist ein deutlicher Unterschied zwischen gramnegativen und grampositiven Bakterien sichtbar. Bei grampositiven Bakterien variiert die Mutationsfolge in Anhängigkeit von der Bakterienspezies und vom verwendeten Chinolonantibiotikum.

Zunächst nahm man an, dass die Topoisomerase IV immer das primäre Target darstellt. Bald jedoch zeigten Untersuchungen, dass Sparfloxacin bei *Streptococcus pneumoniae* zunächst die Gyrase inhibiert (Ferrero *et al.*, 1995; Janoir *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1996, Pan *et al.*, 1997). Es ergeben sich unterschiedliche Mutationsfolgen für die Kombination verschiedener Chinolonantibiotika und Bakterienspezies (Fukuda *et al.*, 1999; Varon *et al.*, 1999). Klinische Resistenzen zeigen sich hier häufiger, da im Gegensatz zu *E. coli* aufgrund der höheren natürlichen Unempfindlichkeit Mutationen im *parC/grlA* Gen oft schon zu MHK-Werten nahe dem klinischen Grenzbereich führen (Schmitz *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1996). Existiert eine Mutation in beiden Genen, so ist beispielsweise für Ciprofloxacin klinische Resistenz immer gegeben.

Bei grampositiven Keimen sind außerdem Effluxpumpen von Bedeutung, die einen erhöhten Auswärtstransport der Substanz aus der Bakterienzelle bedingen, z.B. NorA bei *S. aureus* und PmrA bei *S. pneumoniae* (Kaatz *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 1997). Zu einer Überexpression solcher Effluxproteine kommt es durch Mutationen im Bereich des Promoters, welche eine verminderte Konzentration des Antibiotikums in der Zelle zur Folge hat (Kaatz *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1998). Diese Art der Resistenz tritt zwar häufig auf, erreicht allein jedoch keine klinische Bedeutsamkeit. Sie spielt also nur in Kombination mit Zielstruktur-Mutationen eine entscheidende Rolle bei der klinischen Resistenzentwicklung. Genauer betrachtet sind diese Effluxpumpen Multidrug-Transporter, angetrieben durch einen biochemischen Protonengradienten (Neyfakh *et al.*, 1993). Sie sind in der Lage, verschiedenste Stoffe zu transportieren, wie z.B. Fluorchinolone, Ethidiumbromid, Chloramphenicol und Rhodamin G6. Die Effluxpumpen in *S. aureus* und *S. pneumoniae* gehören zu der Major Facilitator Superfamily (MFS); sie können durch Reserpin, ein pflanzliches Alkaloid, gehemmt werden, wobei sich keine Auswirkungen auf das Zellwachstum ergeben (Markham *et al.*, 1996; Markham,1999). Dies hat zur Folge, dass die in-vitro MHK-Werte der durch Überaktivität der Effluxproteine resistenten Bakterien sinken (Beyer *et al.*, 2000).

In Tabelle 1. sind die am häufigsten vorkommenden Mutationen der Gene *gyrA* und *parC/grlA* mit den entsprechenden MHK-Werten für Ciprofloxacin zusammengefasst.

Spezies	Mutation		MHK für Ciprofloxacin
	Gen: *gyrA*	Gen: *parC*/*grlA*	
S. aureus	-	-	0,25
	-	Ser80Phe	2-4
	-	Ser80Tyr	2
	-	Glu84Lys	2-4
	Ser84Leu	-	1
	Glu88Lys	Ser80Phe	8-16
	Ser84Leu	Ser80Tyr	16
	Ser84Leu	Ser80Phe	8-32
	Ser84Leu	Glu84Lys	8-32
	-	Ser80Phe, Glu84Lys	4
	Ser84Leu	Ser80Phe, Glu84Lys	256
	Glu88Lys	Ser80Phe, Glu84Val	64
S. pneumonia	-	-	1
	Ser81Phe	-	8-16
	Ser81Tyr	-	4-8
	-	Ser79Phe	2-8
	-	Ser79Tyr	2-4
	Ser81Phe	Asp83Asn, Lys137Asn	4
	Ser81Phe	Ser79Phe	8-128
	Ser81Phe	Ser79Phe, Lys137Asn	8-16
	Ser81Tyr	Ser79Phe	32-128

Tabelle 1: Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Mutationen in der Gyrase-Untereinheit *gyrA* und der Topoisomerase IV-Untereinheit *parC*/*grlA* bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* und korrelierenden MHK-Werten für Ciprofloxacin (in mg/l). Tabelle nach Fukuda *et al*. (1999), Pestova *et al*. (1996) und Schmitz *et al*. (1998).

Bei gramnegativen Keimen ist die Affinität der Chinolone zur Gyrase höher als zur Topoisomerase IV, die Gyrase stellt also die primäre Zielstruktur dar. Zur Resistenzvermittlung tritt zunächst eine Einzelmutation in *gyrA* auf. Dies bedingt eine Reduktion der Affinität der Chinolone zur Gyrase, so dass jetzt die Topoisomerase zum ersten Ziel wird. Eine Einzelmutation in *gyrA* löst eine Erhöhung des MHK-Wertes um zwei bis fünf Stufen aus, womit der Grenzwert für klinische Resistenz bei *E. coli* für moderne Fluorchinolone noch nicht erreicht wird. Dies geschieht durch Doppelmutation in *gyrA* und einer zusätzlichen Mutation in *parC*, denn dann steigert sich der MHK-Wert um etwa acht Stufen in Relation zur MHK eines empfindlichen Wildstammes (Heisig, 1997). Abschließend kann gesagt werden, dass sich die Mutation im Topoisomerase IV-Gen phänotypisch also nur in Kombination mit einer Doppelmutation im Gyrase-Gen manifestiert. Wird die Empfindlichkeit der Topoisomerase IV durch eine Mutation in *parC* vermindert, wird die Gyrase wieder zum primären Ziel (Heisig, 1997 und 1994).

1.10 Epidemiologie

Als die Entwicklung der Chinolone und das Interesse der pharmazeutischen Industrie an ihnen in den frühen 80er Jahren ihren Höhepunkt erreichte, erwartete man nicht, dass Resistenzen gegenüber diesen Substanzen in Zukunft ein ernsthaftes Problem darstellen würden. Dennoch wurden Resistenzen gegen Fluorchinolon-Antibiotika in verschiedenen Studien beschrieben (Acar *et al.*, 1993; Kumugai *et al.*, 1996; Thornsberry *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2002; Zhanel *et al.*, 2003) und es ist heute bekannt, dass diese Resistenzen auch in der Klinik, vor allem gegenüber den älteren Chinolonen vorkommen und wahrscheinlich in Zukunft auch weiter ansteigen werden. Dies hätte schwerwiegende Konsequenzen, denn Fluorchinolone zeigten bisher eine gute Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien, gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (einschließlich Methicillin-resistente *S. aureus*) sowie multiresistenten *Mycobacterium tuberculosis*-Stämmen (Everett, 1998).

Die Frequenz für spontane Mutationen liegt zwischen 10^{-6} und 10^{-10} und für die meisten Gentransfervorgänge zwischen 10^{-2} und 10^{-7}, und ohne die Selektion durch Antibiotika würden diese seltenen Ereignisse kaum zum Tragen kommen. Erst der Selektionsdruck hat zur Folge, dass in bestimmten Ökosystemen sensible Bakterien von resistenten Mutanten überwachsen werden. Fast immer entwickeln sich resistente Bakterien aus der natürlichen Flora der Schleimhaut des Nasen-Rachenraums, des Magen-Darm-Traktes oder des Urogenitaltraktes und nicht aus der Population der eine Infektion verursachenden Erreger des Patienten (Wiedemann, 1999). Bei Keimen, deren natürliche Sensibilität für ältere Chinolone gering ist (z.B. *Pseudomonas aeroginosa* und die meisten grampositiven Bakterien), bewirken bereits eine oder zwei Mutationen eine klinisch relevante Resistenz. Im Gegensatz dazu bedarf es bei *Escherichia coli* und den meisten Enterobakterien einer Mehrzahl von Mutationen, um Resistenzentwicklungen auszulösen, da sie sehr empfindlich auf ältere Fluorchinolone reagieren. Aus diesem Grund wurde auch zunächst angenommen, dass Ciprofloxacin-resistente Stämme gar nicht erst auftreten würden. Es dauerte tatsächlich zehn Jahre, bis die ersten resistenten klinischen Isolate in Erscheinung traten. Heute existieren Resistenzprobleme vor allem in den gefährdeten Bereichen der Krankenhäuser, also auf den Intensivstationen. Die neueren Fluorchinolone mit höherer Wirksamkeit gegen grampositive sowie atypische Erreger und Anaerobier erlangen einen größeren Stellenwert bei ambulant erworbenen respiratorischen Infekten, Harnwegsinfekten und anderen Infektionen. In welchem Ausmaß es durch diese vermehrte Applikation zu einem Resistenzanstieg kommen wird, lässt sich nur schwer voraussagen. In Einzelfällen konnte eine gute Korrelation zwischen verabreichter Antibiotikamenge und Resistenzentwicklung beobachtet werden, dennoch besteht kein direkter Zusammenhang zwi-

schen diesen Größen. Die Begründung liegt in der unterschiedlichen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bei den jeweiligen Präparaten.

Geografisch betrachtet ist die Resistenz gegen Fluorchinolone auf der südlichen Halbkugel in den entwickelten Ländern wie Australien und Neuseeland geringer ausgeprägt als in den Entwicklungsländern Korea, China und den Philippinen. Man führt dies auf den unkontrollierten Gebrauch und den illegalen Verkauf von Imitaten zurück (Turnidge, 1994).

Die immer häufiger vorkommende Penicillin-Resistenz bei *Streptococcus pneumoniae* ist zunehmend auch mit einer Multiresistenz gegenüber anderen Antibiotikaklassen, wie z.B. Tetrazyklinen, Makroliden etc. vergesellschaftet (Schmitz *et al.*, 2001, 48; Schmitz *et al.*, 2001). Aufgrund dessen kam es in den letzten Jahren zu einer vermehrten Verwendung von Fluorchinolonen bei der Therapie von Atemwegsinfektionen, was letztendlich eine langsam zunehmende Resistenzentwicklung auch gegenüber dieser Antibiotikaklasse nach sich zog. Allerdings ist in Deutschland eine Resistenz von *S. pneumoniae*-Isolaten gegenüber Fluorchinolonen bislang noch unbedeutend (Reinert *et al.*, 2004). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine Resistenz gegenüber Chinolonen durch einen horizontalen Transfer der Zielstruktur-Gene *gyrA* bzw. *parC* von anderen Streptokokken-Spezies auf *S. pneumoniae*-Isolate übertragen werden. Janoir *et al.* konnten z.B. nachweisen, dass die Zielstruktur-Gene von *Streptococcus mitis, Streptococcus sanguis, Streptococcus oralis* und *Streptococcus constellatus* auf *S. pneumoniae* transferiert werden können (Janoir *et al.*, 1999). Desweiteren zeigten auch Gonzalez *et al.*, dass die Fluorchinolon-Resistenz vermittelnden Determinanten von einigen klinischen *Streptococcus viridans*-Isolaten in-vitro durch Transformation auf *S. pneumoniae* übertragen werden können (Gonzalez *et al.*, 1998). Ingesamt spielt dieser Transfer-Mechanismus für die Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* gegenüber Chinolonen aber eine eher untergeordnete Rolle (Bast *et al.*, 2001).

Trotzdem scheint es sinnvoll, eine strenge Überwachung einer eventuell zunehmenden Resistenzentwicklung auch dieser Streptokokken-Spezies gegenüber Chinolonen vorzunehmen, da die oben genannten Isolate potentielle Überträger der Resistenz-determinanten darstellen (Gonzalez *et al.,* 1998; Guerin *et al.*, 2000; Janoir *et al.,* 1999).

Ein zusätzlicher wichtiger Aspekt stellt neben der in-vitro-Aktivität einer Substanz, auch die möglichst langsame Resistenzentwicklung gegenüber einer Substanz dar, insbesondere bei *S. pneumoniae*. Studien von Lu *et al.* und Schmitz *et al.* zeigten deutlich, dass Chinolone mit einem C8-Methoxy-Rest, wie z.B. Moxifloxacin und Gatifloxacin gegenüber anderen Fluorchinolonen eine entschieden langsamere Resistenzentwicklung aufwiesen (Lu *et al.,* 1999; Schmitz *et al.*, 2001).

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass auch unter optimalen Bedingungen mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Fluorchinolonen zu rechnen ist und aus diesem Grund die Entwicklung neuerer und wirksamerer Präparate unabdingbar wird. BMS-284756 ist eine dieser neuen Substanzen, deren Wirksamkeit in der folgenden Arbeit näher analysiert werden soll. Ebenfalls neuere Fluorchinolone, die auch teilweise schon auf den Markt gebracht wurden, sind Clinafloxacin, Gatifloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin.

2 Zielsetzung

Wie zu Beginn erläutert, kann eine stetige Zunahme der Antibiotikaresistenzen bei wichtigen Erregern beobachtet werden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Epidemiologie der Resistenzen und die dazu führenden Resistenzmechanismen bei Fluorchinolonen analysiert werden. Die vorliegende Studie umfasste Bakterienisolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des SENTRY-Überwachungsprogramms gesammelt wurden. Sowohl klinische *S. aureus*- und *S. pneumoniae*-Isolate als auch diverse *Enterobacteriaceae*-Isolate wurden hinsichtlich ihrer zugrunde liegenden Resistenz-mechanismen analysiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der in-vitro-Aktivität verschiedener Substanzen gegenüber diesen Keimen.

Zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen erfolgt zunächst ein Vergleich der Wirksamkeit einzelner Fluorchinolone. Es ist sinnvoll herauszufinden, welche Antibiotika bei der Therapie einer durch *S. aureus* ausgelösten Erkrankung am wirkungsvollsten, aber auch bedenkenlos im Hinblick auf eine schnelle Resistenzausbreitung eingesetzt werden können. Außerdem wurde die Häufigkeit auftretender Resistenzen und die Epidemiologie der Resistenzmutationen näher analysiert, wobei bei *S. aureus* die Resistenzverteilung innerhalb Europas von besonderem Interesse war. Da bei Pneumokokken die Resistenzen noch nicht so stark ausgeprägt sind, umfasste die Untersuchung lediglich die Feststellung der Häufigkeit resistenter Keime innerhalb Europas.

Ein weiterer Punkt war die Untersuchung des Einflusses von Effluxpumpensystemen auf die Chinolonresistenz. Anschließend wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt, um die auftretenden Mutationen in den ORDR der Gene für Gyrase und Topoisomerase IV darzustellen sowie ihre Häufigkeit, Kombinationen und die resultierenden MHK-Werte zu ermitteln.

Die Gruppe der *Enterobacteriaceae* ist ein weiterer häufiger Vertreter opportunistischer Infektionen. Die Fragestellung lautet hier, inwieweit kombinierte Mutationen zu höheren MHK-Werten führen als einzelne Mutationen. Die Bedeutung der auftretenden *gyrA*- und *parC*-Mutationen soll genau untersucht werden, wobei auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Vertretern dieser Spezies berücksichtigt werden. Man weiß heute genau, dass Mutationen eine Ursache von Resistenzentwicklungen gegen Flourchinolonantibiotika in klinischen Isolaten darstellen. Diese Mutationen können an mehreren Stellen der DNA-Genloci auftreten, wobei bisher noch unklar ist, welcher Mechanismus die Reihenfolge dieser Mutationen

festlegt. Überprüft werden soll also, in welchem Genlocus zuerst Mutationen auftreten und welche dieser Veränderungen entscheidend für die Resistenzentwicklung sind.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es im wesentlichen um die Analyse der in-vitro-Aktivität von BMS-284756, einem Chinolon ohne ein Fluoratom in C-6-Position, gegennüber den bereits zuvor genannten Bakterienspezies.
Um einen Überblick über mögliche Unterschiede in der Resistenzentwicklung von BMS-284756 zu gewinnen, erfolgte die MHK-Bestimmung von BMS und verschiedenen Fluorchinolonen gegenüber weniger Stämme von *S. aureus, S. pneumoniae* und *S. pyogenes* und die anschließende Erfassung der auftretenden Mutationen.
Außerdem wurden *S. aureus*-Stämme mit definierten Mutationen in den QRDR von *gyrA*, *gyrB* und *grlA* und mit unterschiedlichen Resistenztypen (hetero-Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* bzw. „hetero-VISA“ und Methicillin-resistenter *S. aureus* bzw „MRSA“) der MHK-Analyse unterzogen.
Von besonderer Bedeutung war auch die Untersuchung der in-vitro-Aktivität von BMS bei *S. pneumoniae*-Stämmen mit diversen Resistenzphänotypen und verschiedenen anderen Streptokokken-Spezies mit definierten Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *parC* und mit unterschiedlichen Resistenzphänotypen. Dies erfolgt durch einen Vergleich mit verschiedenen anderen Fluorchinolonen, wobei eine nähere phänotypische und genotypische Charakterisierung der hierbei selektierten Mutanten vorgenommen wird. Eine weitere Aufgabe stellt die Überprüfung der Tendenz zur Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* gegenüber BMS-284756 im Vergleich zu verschiedenen anderen Fluorchinolonen dar.
Bei sämtlichen Versuchsreihen wurde zusätzlich der Reserpineffekts auf die MHK-Werte von BMS-284756 analysiert um herauszufinden, ob ein Transport dieses Des-Fluorchinolons durch die bekannten Multidrug-Effluxpumpen für die Resistenzentwicklung mit verantwortlich sein könnte.
Hinsichtlich der Enterobakterien war von besonderem Interesse, ob BMS-284756 gegenüber klinischen *K. pneumoniae*-, *K. oxytoca*- und *E. cloacae*-Isolaten eine schnellere oder langsamere Resistenzentwicklung aufweisen würde verglichen mit herkömmlichen Chinolonen. Zu diesem Zweck bestimmten wir die MHK-Werte jeder Spezies für Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin und BMS. Zusätzlich charakterisierten wir die Mutationen in den QRDRs von allen Chinolon-resistenten Mutanten.

Zusammengefaßt ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Resistenzmechanismen von gram-positiven Keimen, insbesondere *S. pneumoniae* und *S. aureus* und gram-negativen Keimen, insbesondere Enterobakterien näher zu analysieren. Es soll vor allem auf die Unterschiede dieser Gruppen bezüglich ihres Resistenzverhaltens geachtet werden. Die Bedeutung der neuen Substanz BMS-28476 soll genau überprüft werden, indem ihre Wirksamkeit gegen diese klinisch bedeutsamen Errger im Vergleich zu älteren und neueren Fluorchinolonen anhand der MHK-Werte kontrolliert werden soll. Der Einfluß des Effluxpumpenhemmers Reserpin auf die ermittelten MHK-Werte war von besonderer Bedeutung. Desweiteren sollen die primären targets der Fluorchinolone und die resultierenden Mutationen bei allen Spezies näher untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Reinheit verwendet.

Acrylamidgel (29:1) 40%ige Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (29:1) in Aqua bidest.	Sigma
Agarose	Sigma
APS=Ammoniumpersulfat-Lösung 10% 1,0 g Ammoniumpersulfat 10,0 ml H_2O	Ambresco
Dextranblau/EDTA : 25mM EDTA pH 8,0; 50 mg/ml DB	
Formamid (Verhältnis Formamid: DB/EDTA 5:1)	Ambresco
EDTA	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Optochinplättchen	Sigma
Reserpin	Sigma
Tris	Merck
Blue-Marker (6 x conc. Gelladungspuffer) Bromphenolblau (0,25% w/v) = BPB Xylenecyanole FF (0,25% w/v) Sucrose (40% w/v) Verdünnung mit Glycerin 1:1	Gibco BRL

Essigsäure konz.	Merck
Ethanol (absolut)	Riedel de Häen
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	BioRad
1 kb DNA Molekulargewichtsmarker (10 µl Aliquots mit 1 µg Marker) 1,0 µl Marker 7,5 µl Aqua bidest. 1,5 µl 6xPBP	Gibco BGL
Koagulasetestlösung	Pharmacia
Salzsäure konz.	Merck
TBE-Puffer 89mM **T**ris; 89 mM **B**orsäure; 2,5 mM **E**DTA	Eigenherstellung
TE-Puffer pH 8,0 10mM **T**ris/HCl; 1mM **E**DTA	Eigenherstellung
TEMED = N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine	Ambresco

3.1.2 Antibiotika

BMS-284756 (BMS)	Bristol-Myer Squibb
Ciprofloxacin (Cipro; CIP)	Bayer AG
Clinafloxacin (Clina)	Parke-Davies
Gatifloxacin (Gati; GAT)	Grünenthal
Gemifloxacin (Gemi; GEM)	Pfizer
Levofloxacin (Levo; LEV)	Rhône-Poulanc-Rorer
Moxifloxacin (Moxi; MOX)	Bayer AG
Sparfloxacin (Spar)	Aventis
Sitafloxacin (Sita)	Daichi
Trovafloxacin (Trova)	Pfizer
Optochin Testblättchen (50µg pro Testblättchen)	Oxoid
Oxacillin Testblättchen (5 µg pro Testblättchen)	Becton Dickinson

3.1.3 Fertig-Kits

Expand High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim
1. Enzyme mix, high fidelity (Taq-Polymerase)	
2. Expand HF buffer, 10 x conc. Without $MgCl_2$	
3. $MgCl_2$ stock solution: 25 mM $MgCl_2$	
PCR-Purification-Kit	Quiagen
PCR Nucleotid-Mix	Boehringer Mannheim
Terminator Ready RXN Mix (Sequenzienziermix)	Perkin-Elmer
ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Premix)	Perkin-Elmer
Mikrobank mit Kryolösung und porösen Keramik-Kügelchen	ProLab

3.1.4 Nährmedien

Mueller-Hinton (MH) Bouillon und Agar — Oxoid
(mit oder ohne Blutzusatz)

Die Bouillon wurde verwendet, um Übernachtkulturen und MHK-Tests bei Staphylokken durchzuführen, wobei für den den MHK-Test an sich die Bouillon in doppelter Konzentration angesetzt wurde. Auf den bluthaltigen Agarplatten wurden Pneumokokken und Staphylokokken gezüchtet. Für Agardiffusionstests bei Staphylokokken wurden Agarplatten ohne Blut verwendet.

Zusammensetzung Bouillon:

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g:	2,0 g/l
Caseinhydrolysat:	17,5 g/l
Stärke:	1,5 g/l

Zusammensetzung Agar (pH 7,4):

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g:	2,0 g/l
Caseinhydrolysat:	17,5 g/l
Stärke:	1,5 g/l
Agar:	17,0 g/l
Evtl. Zusatz von Schafserythrozyten	

Tryptic-Soja-Bouillon (TSB) Becton-Dickinson

Dieses Nährmedium wurde für Flüssigkulturen von Pneumokokken und zur MHK-Bestimmung bei Pneumokokken verwendet. Für die MHK-Bestimmung wurde die Bouillon in doppelter Konzentration angesetzt.

Zusammensetzung:

Trypton:	17,0 g/l
Sojamehlpepton	3,0 g/l
D-Glukose:	2,5 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat:	2,5 g/l
Ph-Wert: 7,4	

DNAse Agar Oxoid

BHI-Agar (37 g/l) Difco

Zusammensetzung:

Nährstoffkonzentrat aus 200 g Kalbshirn	
Nährstoffkonzentrat aus 250 g Rinderherz	
Proteosepepton	10,0 g
D-Glukose	2,0 g
NaCl	5,0 g
$Na_2(HPO_4)$	2,5 g

3.1.5 Primer

Alle Primersequenzen wurden nach den in der Gene Bank veröffentlichten Gensequenzen ausgewählt und nach unseren Vorgaben von Pharmacia synthetisiert.
Die Primersequenzen für die einzelnen Gene sind:

S. aureus

GrlA FW 5'-ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT

REV 5'-TTAGGAAATCTTGATGGCAA

GrlB FW 5'-CGATTAAAAGCACAACAAGCAAGG

REV 5'-CATCAGTCATAATAATTACAC

GyrA FW 5'-AATTGAACAAGGTATGACACC

REV 5'-TACGCGCTTCAGTATAACGC

S. pneumoniae

GyrA FW 5'-CCGTCGCATTCTCTATGGAATGAA

REV 5'-AGTTGCTCCATTGACCAAAAGGTT

GyrB FW 5'-AGATTGCCAAACGTATCGTAGA

REV 5'-TGGGCTCCATCGACATCGGC

ParC FW 5'-AAGGATAGCAATACTTTTGAC

REV 5'-GTTGGTTCTTTCTCGGTATCG

ParE FW 5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC

REV 5'-TCTGCTCCAACACCCCCA

Enterobacteriaceae

Die Primer der *Enterobacteriaceae* für *gyrA* und *parC* wurden so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich der Bakterien-DNA homolog zu der QRDR von *E. coli* war (Yoshida *et al.*, 1990).

E. aerogenes/cloacae (Deguchi *et al.*, 1997)

GyrA FW 5'-CGTACTTTACGCCATGAACG

REV 5'-GACGGATTTCCGTATAACGC

ParC FW 5'-GCCTGAATGCCAGCGC

REV 5'-CGCGAACGATTTCGGATCG

K. oxytoca

Beide *gyrA*-Primer wurden aus der korrespondierenden *K. pneumoniae*-Sequenz ausgewählt, wobei der forward-Primer den Nukleotiden 139-162 und der reverse-Primer den Nukleotiden 558-579 entspricht (National Comittee For Clinical Laboratory Standards, 1998). Die *parC*-Primer wurden aus der korrespondierenden *E. coli*-Sequenz ausgewählt, wobei der forward-Primer den Nukleotiden 104-126 und der everse-Primer den Nukleotiden 524-545 entspricht (Kato *et al.*, 1998).

GyrA FW 5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA

REV 5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG

ParC FW 5'-ATGGACCGTGCGTTGCCGTTTAT

REV 5'-CGGCAATACCGGTGGTGCCGTT

K. pneumoniae

Die *gyrA*-Primer entsprechen denen von *Klebsiella oxytoca* (Dimri, 1990). Die *parC*-Primer wurden aus der korrespondierenden *E. coli*-Sequenz ausgewählt, wobei der forward-Primer den Nukleotiden 185-204 und der reverse-Primer den Nukleotiden 554-573 entspricht (National Comittee For Clinical Laboratory Standards, 1998).

GyrA FW 5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA

REV 5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG

ParC FW 5'-CTGAATGCCAGCGCCAAATT

REV 5'-TGCGGTGGAATATCGGTCGC

3.1.6 Geräte

Autoklav	Westima-Sauter
Spektralphotometer	Dr. Lange
Elektrophoresekammern (und Zubehör)	BioRad
Spannungsgerät	BioRad
Mikrotiter-Photometer	Microscan
Analysenwaage und Grobwaage	Sartorius
Thermocycler	Perkin-Elmer
Tischzentrifugen	Heraeus
Thermoschüttler	Eppendorf
DNA-Sequenzer 377	ABI Prism
Vortexer	Witeg elektrik
Sterilbank	Bio Gardhood
Pipetten	Eppendorf, Gillson, Finn
Mehrkanalpipetten	BioHit Pro Line, Finn
Multipipetten	Eppendorf, Gillson
Glasgeräte	Schott
Petrischalen	Greiner
Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten, gerade Bodenform)	Greiner
Prompt Inokulationssystem (DADE)	Microscan

3.1.7 Plastik- und Einwegartikel

Plastikartikel, Reaktionsgefäße und Mikrotiterplatten stammten von den Firmen Greiner, Biozym, Eppendorf und Perkin-Elmer.

3.1.8 Bakterienstämme

Der überwiegende Teil der Bakterienstämme stammt aus der SENTRY-Studie (Schmitz *et al.*, 1998), dessen Referenzzentrum sich in Utrecht in den Niederlanden befindet. Inhalt des SENTRY-Programmes ist eine langfristig angelegte Surveillance Studie zur Beobachtung der am häufigsten vorkommenden Krankheitserreger und der sich konsekutiv entwickelnden Resistenzen gegenüber 26 Antibiotika. Dies dient der Überwachung des Resistenzverhaltens von Keimen, die nosokomial oder ambulant erworbene Infektionen verursachen können (Jones *et al.,*1994; Schmitz *et al.,* 1998).

Zu beachten war, dass jeweils nur ein Isolat pro Patient untersucht wurde, das zuvor anhand von vorgegebenen Kriterien als klinisch signifikant eingestuft worden war. Bei Isolaten, die Resistenzen aufwiesen, wurden die klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen molekularepidemiologisch analysiert. Die Isolate stammen aus folgenden Universitätskliniken:

- Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland
- Universitätskliniken Freiburg, Deutschland
- University Hospital Utrecht, Niederlande
- Krankenhaus der Elisabethinen, Linz, Österreich
- CHUV, Lausanne, Schweiz
- Hopital St. Joseph, Paris, Frankreich
- Hopital de la Pitie-Salperiere, Paris, Frankreich
- Hopital Eduard Herriot, Lyon, Frankreich
- A. Calmette Hopital, Lille, Frankreich
- Hopital Erasme, Brüssel, Belgien
- Sera and Vaccines Research Laboratory, Warschau, Polen
- University Hospital Warsaw, Polen
- Jagiellonian Universitiy, Krakau, Polen
- St. Thomas Hospital Medical School, London, Großbritannien
- National University of Athens, Griechenland
- University of Genoa, Italien
- University of Rome, Italien

- University Hospital of Coimbra, Portugal
- University Hospital of Sevilla, Spanien
- Hopital Ramon y Cajal, Madrid, Spanien
- Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spanien

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Die entsprechenden Kulturmedien wurden mit einer von der Stammplatte entnommenen Einzelkolonie beimpft und bei 37ºC über Nacht kultiviert. Zur Aufbewahrung der Stämme wurden diese als Reinkultur auf MH- oder Blutagarplatten bei 30-37ºC für 24-48 Stunden angezogen und bei 4ºC bis zu drei Wochen aufbewahrt.

3.2.1.2 Bakterienkonservierung

Zur Gewährleistung einer sicheren Bakterienkonservierung diente die sterile Überführung einer auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonie auf Mikrobank. Hierbei handelte es sich um sterile Plastikröhrchen mit Schraubverschluss. Der Inhalt bestand aus 1 ml flüssigem Kryomedium mit 25 Plastikkügelchen (Durchmesser ca. 1,5 mm), die durch Säurebehandlung eine poröse Oberfläche aufwiesen. Fand die sterile Überführung einer Bakterienkolonie in das Röhrchen statt, folgte nach dem Verschluß des Gefäßes ein vorsichtiges vier- bis fünfmaliges Umschwenken unter Vermeidung von Schaumbildung, um anschließend das Kryomedium mittels steriler Pipette abzusaugen. Während des Umschwenkens lagerten sich die Bakterienzellen fest an die Kügelchen. Das sich daran anschließende Einfrieren erfolgte bei -20 bis -70ºC. Bei der Anzüchtung der Bakterien in Flüssigmedium und dem Ausstreichen auf Agarplatten kamen die aufgetauten Kügelchen zur Verwendung.

3.2.1.3 Wachstumsmessung

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 535 nm mit einem Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz diente jeweils das entsprechende unbeimpfte Medium.

3.2.1.4 Messung der optischen Dichte

Man kann die ungefähre Zellkonzentration einer Bakteriensuspension durch Messung der optischen Dichte ermitteln. Dazu wird die Zellsuspension in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer gemessen. Dabei kommt es zu einer Streuung des Lichtstrahls, der durch die Küvette tritt. Bei konstanter Zellgröße ist dann die Extinktion bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,3 proportional zur Zellkonzentration; sie folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$E = -\lg I/I_0 = e \cdot c \cdot d$

E = Extinktion
I_0 = Eingangslichtstärke
I = Ausgangslichtstärke
e = molarer Absorptionskoeffizient (1/g·cm)
c = Konzentration (mol/l)
d = Schichtdicke

Als Referenz verwendet man das Probenmedium. Die Messung erfolgt bei 535 nm.

3.2.1.5 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Eine Bakteriensuspension wurde in Zehnerschritten bis 10^{-9} verdünnt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-9} wurden je 0,1 ml auf einer Agarplatte ausgestrichen.
Die Platten wurden 24 Stunden lang bei 37ºC inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf einer Platte multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und 10 (da ja nur 0,1 ml ausgestrichen wurden), ergab die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml. Dies entsprach der Menge der Lebendkeime in der Suspension.

3.2.1.6 Sterilisation

Sämtliche verwendete Pipettenspitzen und Eppendorfcups, alle Medien, destilliertes Wasser sowie infektiöse Abfälle wie Mediumreste oder bewachsene Agarplatten wurden im Autoklaven bei 120ºC und 1,2 bar Überdruck bei einer Haltezeit von 20 Minuten sterilisiert. Thermolabile Zusätze wie Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert und zugesetzt.
Glasgeräte wurden nach dem Spülen bei 160ºC für 8 Stunden im Trockenschrank erhitzt.

3.2.1.7 Methoden zur Identifizierung von Bakterien

Eine Voridentifizierung erfolgte nach dem Aussehen der Kolonien auf einer MH-Blut-Platte und nach dem mikroskopischen Bild.

- ***Staphylococcus aureus***

  a) Katalase-Test:

  Für den Katalase-Test wurden Bakterienkolonien in Wasserstoffperoxid verrieben. Bei Katalase-positiven Bakterien sollten Gasblasen aufsteigen, da Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird gemäß der Formel: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 0_2$.

  b) Koagulase-Test:

  S.aureus bildet das Enzym Koagulase. In der Koagulasetestlösung sind Kaninchenplasma und Schafserythrozyten enthalten. Das Fibrinogen aus dem Plasma reagiert nun mit der Koagulase, dies führt zur Agglutination der Erythrozyten. Eine Bakterienkolonie wird auf einem Objektträger mit der Koagulaselösung verrieben. Ist der Test positiv, ist eine Agglutination sofort sichtbar. Anschließend führt man eine Negativkontrolle mit Wasser statt Koagulaselösung durch.

  c) Nuclease –Test (DNase):

  Der Nachweis der DNase wurde mit Hilfe des DNase-Agars (Oxoid) vorgenommen. Der Test beruht auf der Hydrolyse der im Nährmedium enthaltenen DNA zu kurzkettigen Polynukleotiden durch die gebildete DNase. Eine Kolonie der zu untersuchenden Isolate wurde zusammen mit einer Positiv- und Negativkontrolle auf einer DNA-haltigen Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37ºC wurde der Nährboden mit 1M HCl überschwemmt, so dass ungespaltene DNA durch Präzipitation als Trübung des Mediums sichtbar wurde. Bei DNase-positiven Stämmen blieb diese Trübung aus.

- ***S. pneumoniae***

  d) Optochin-Test:

  Pneumokokken reagieren im Gegensatz zur oralen Streptokokken, die auf der Agarplatte ähnlich aussehen, empfindlich auf das Gallensalz Optochin. Zum Nachweis dieser Empfindlichkeit suspendiert man einige Kolonien von einer frisch bewachsenen Agarplatte in physiologischer Kochsalzlösung. 100 µl dieser Suspension werden gleichmäßig auf einer Agarplatte verteilt. Nach 5 Minuten Trocknungszeit wird ein optochinhaltiges Plättchen (Merck) auf die Agarplatte gelegt und diese 24 h bei 37ºC und 5% CO_2-Partialdruck bebrütet. Handelt es sich wirklich um Pneumokokken, muß der Hemmhof um das Testblättchen herum mindestens 14 mm Durchmesser betragen.

- ***Enterobacteriaceae***

  e) MicroScan Walk Away 96 System (=DADE)

  Hierbei handelt es sich um einen Computer-gestützten Vollautomaten zur Inkubation von Mikrotiterplatten, der die Ergebnisse der biochemischen Identifikation und Resistenzbestimmung von Mikroorganismen selbstständig durch eine photometrische bzw. fluorometrische Messung auswertet (Schmitz *et al.*, 1997). Die Mikrotiterplatten beinhalten Testfelder, die mit spezifischen Substanzen gefüllt sind. Die Summe der Reaktionen dieser Subsatnzen mit den zu untersuchenden Bakterien gibt Aufschluss über die Bakterienspezies und führt letztendlich zu einer Identifizierung. Die Identifizierung der gramnegativen Bakterien basierte auf pH-Veränderungen, Substratverbrauch und dem Vorhandensein von Wachstum in Gegenwart von spezifischen Antibiotika. Die Bebrütung dauerte 16-42 Stunden. Anschließend vergleicht die hierbei benutzte Software die Resultate der Resistenzbestimmungen mit vorgegebenen Normalwerten. Die weitere Bearbeitung erfolgt nur an Bakterienisolaten, deren ursprüngliche Identifizierung mit der des DADE's übereinstimmen bzw. erfolgt eine Wiederholung bei einer abweichenden Identifizierung. Bestätigt sich das abweichende Ergebnis abermals, wird die vom DADE angezeigte Identifizierung übernommen.

  Testfelder der Mikrotiterplatten für gram-negative Bakterien

Glukose	Saccharose	Sorbitol
Raffinose	Rhamnose	Arabinose
Inositol	Adonitol	Melibiose
Harnstoff	H-Sulfid	Indol
Lysin	Arginin	Ornithin
Tryptophan-Desaminase	Esculin	Citrat
Voges-Proskauer	Malonat	Tartrat
o-Nitrophenyl-β,D-Galaktopyranosid	Acetamid	Cetrimid
OF Glukose	OF Base	Nitrat
Decarboxylase-Base	Penicillin[3]	Kanamycin*
Colistin*	Nitrofurantoin*	Cephalothin*
Tobramycin*		

In folgenden Tabellen ist die Identifizierung der verwendeten *E. aerogenes*- und *E. cloacae*- sowie der *K. spp*.-Isolate aufgeführt:

[3] Antibiotika zu Bestimmungszwecken

ENARE Nummer	Ciprofloxacinresistent 5µg/ml	Identifiziert als folgende Entero-bacter-Spezies (DADE)	Arbeitsnummer
01A089	Ja	aerogenes	1
01D028	Ja	aerogenes	2
02A002	Ja	aerogenes	3
02A026	Ja	aerogenes	4
02A044	Ja	aerogenes	5
02A056	Ja	aerogenes	6
02A081	Ja	aerogenes	7
02A288	Nein	-	
05A053	Ja	aerogenes	8
05A287	Ja	aerogenes	9
05C025	Ja	cloacae	10
05D043	Nein	-	
06A041	Ja	aerogenes	11
06A110	Ja	aerogenes	12
06A1280	Ja	aerogenes	13
06A146	Ja	cloacae	14
06C014	Ja	aerogenes	15
06D012	Ja	aerogenes	16
06D013	Ja	aerogenes	17
06D051	Ja	aerogenes	18
06D009	Ja	aerogenes	19
09A019	Ja	cloacae	20
09A170	Ja	aerogenes	21
09A224	Ja	cloacae	22
09D026	Ja	cloacae	23
09D048	Ja	cloacae	24
09E045	Ja	cloacae	25
10A143	Ja	cloacae	26
10A147	Ja	cloacae	27
10A189	Ja	cloacae	28
10A195	Ja	cloacae	29
10C003	Ja	cloacae	30
10C015	Ja	cloacae	31
11D049	Nein	-	
14E001	Ja	cloacae	32
15A067	Ja	cloacae	33
15E034	Nein	-	
15E042	Ja	cloacae	34
15E055	Ja	aerogenes	35
17E009	Ja	cloacae	36
20A110	Nein	-	
20A030	Ja	cloacae	37
20A042	Ja	cloacae	38
20A067	Ja	aerogenes	39
20B034	Ja	aerogenes	40
Ent1	Nein	aerogenes	41
Ent2	Nein	aerogenes	42
Ent3	Nein	aerogenes	43
Ent4	Nein	cloacae	44
Ent5	Nein	cloacae	45
Ent6	Nein	cloacae	46

Tabelle 2: Identifizierung der verwendeten *E. aerogenes*- und *E. cloacae*-Stämme.

ENARE Nummer	Ciprofloxacinresistent 5µg/ml	Identifiziert als folgende Kleb-siella-Spezies (DADE)	Arbeitsnummer
01A112	Ja	oxytoca	1
01A233	Ja	pneumoniae	2
01A251	Ja	pneumoniae	3
01C013	Ja	pneumoniae	4
02A098	Ja	pneumoniae	5
02A112	Ja	pneumoniae	6
02B067	Ja	pneumoniae	7
02B114	Ja	oxytoca	8
02C109	Ja	pneumoniae	9
03A056	Ja	pneumoniae	10
03D076	Ja	pneumoniae	11
04A021	Ja	pneumoniae	12
04A035	Ja	pneumoniae	13
04A117	Nein	-	
06A113	Ja	pneumoniae	14
06A234	Ja	pneumoniae	15
07C054	Ja	pneumoniae	16
07D032	Ja	pneumoniae	17
08A063	Ja	pneumoniae	18
08D099	Ja	pneumoniae	19
12A034	Ja	pneumoniae	20
12A038	Nein	-	
15A067	Ja	pneumoniae	21
17A066	Ja	pneumoniae	22
18A123	Ja	pneumoniae	23
18A223	Ja	oxytoca	24
18B232	Nein	-	
19A167	Ja	pneumoniae	25
20A112	Ja	oxytoca	26

Tabelle 3: Identifizierung der verwendeten Klebsiella-spp.-Isolate.

3.2.1.8 Resistenzprüfungen

a) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK ist eine stammspezifische Größe, d.h., für jeden Bakterienstamm gilt eine andere MHK. Es wurde die Methode der Mikrodilution angewandt: Eine Übernachtkultur eines Bakterienstamms wird auf $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ Zellen verdünnt. Es wird eine vierfach konzentrierte Stammlösung des jeweiligen Antibiotikums hergestellt. Dies 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 100µl zweifach konzentrierte Bouillon vorgelegt. In die erste Reihe werden 100µl der Stammlösung zugefügt und durch Pipettieren gemischt. Dann werden wiederum 100µl dieser Mischung entnommen und in die Vertiefungen der nächsten Reihe

gegeben. Man erreicht so eine 1 : 2 Verdünnung. Durch Pipettieren wird wiederum gemischt, usw.. Nur die letzte Reihe wird ausgespart, sie enthält die Wachstumskontrollen. In jede Vertiefung werden nun noch 100µl der verdünnten Bakteriensuspension hinzupipettiert. Nun wird die Platte ca. 24 h bei 37ºC bebrütet. Dann erfolgt die Auswertung, indem der MHK die niedrigste Konzentration des Antibiotikums darstellt, bei der noch kein sichtbares Wachstum festgestellt werden kann.

b) Reserpin-Test

Zur Überprüfung eines Efflux-Pumpeneinflusses auf MHK-Werte wurde der Effluxhemmer Reserpin eingesetzt.

Die Versuchsdurchführung entsprach der des MHK-Tests, wobei Reserpin in einer Konzentration von 20 mg/ml hinzugefügt wurde. Parallel wurde die MHK ohne Reserpin bestimmt. Ein Effluxeinfluss lag vor, wenn die MHK unter Reserpin mindestens um zwei Stufen abnahm.

c) Agar-Diffusionstest

Dieser Test diente dazu, eine rein qualitative Aussage über die Resistenz, intermediäre Resistenz oder die Sensibilität eines Stammes gegenüber eines bestimmten Antibiotikums zu machen. Zur Durchführung des Tests wurde eine Kolonie des entsprechenden Stammes in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Von der Suspension wurden 0,5 ml auf einer Mueller-Hinton-Platte ausgestrichen. Nachdem die Platte etwas getrocknet war, wurde für jedes Antibiotikum ein Testblättchen aufgelegt und leicht angedrückt. Dieses Blättchen besteht aus Filterpapier, an das das Antibiotikum adsorbiert ist (wobei die Menge je nach Blättchen und Antibiotikum unterschiedlich ist; sie bewegt sich zwischen 5 und 200µg). Auf eine Agar-Platte passen 7 Blättchen: eines in die Mitte und sechs zirkulär darum herum angeordnet.

Die Platten wurden eine Nacht lang bei 37ºC inkubiert, während dieser Zeit diffundierte das Antibiotikum aus dem Testblättchen in den Agar. Deshalb bildete sich um das Blättchen herum ein Hemmhof, in dem keine Bakterien wuchsen. Der Durchmesser des Hemmhofs gab Aufschluss darüber, ob der getestete Stamm resistent (R), intermediär resistent (I) oder sensibel (S) war. Die genauen Werte können aus Tabellen, die zu den jeweiligen Testblättchen vom Hersteller herausgegeben werden, abgelesen werden.

d) Agardilution

Die weitere Charakterisierung der Mutanten erfolgte über Agardilution. Entsprechend den Egebnissen der Agardilution wurden die Mutanten in Gruppen eingeteilt.

Es wurden antibiotikahaltige Platten angefertigt, die folgende Konzentrationen aufwiesen:

Ciprofloxacin: 2-, 4-, 6- und 8-fache MHK
Sparfloxacin: 2-, 4-, 8- und 16-fache MHK
Gatifloxacin: 2,5-, 3- und 4-fache MHK
Moxifloxacin: 2-, 2,5-, 3- und 4-fache MHK
Clinafloxacin: 3-, 4- und 8-fache MHK

Einige Mikrotiterplatten werden mit je 100 µl MH-Bouillon pro Vertiefung versehen und jede Vertiefung mit einem Mutantenstamm beimpft. Eine Vertiefung wird mit dem Wildstamm beimpft. Die Platten werden über Nacht bei 37ºC bebrütet. Die gleiche Menge MHK-Platten werden mit je 200 µl isotonischer Kochsalzlösung versehen. Der Stempel wird abgeflämmt, in die Übernachtkulturen eingetaucht und dann in die entsprechenden Vertiefungen der Kochsalzplatte überführt. Dieser Verdünnungsschritt wird nochmals wiederholt. Dann wird der Stempel in die Kochalzplatten eingetaucht und vorsichtig auf die antibiotikahaltigen Platten gedrrückt. Als erste und letzte Platte 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 das Wachstum eines Stammes nicht durch zufällige Fehler beim Überimpfen erfolgt. Die Platten werden mindestens 24 h bei 37ºC inkubiert.

e) Bestimmung der spontanen Mutationsrate

Bakterien sind in der Lage, unter Antibiotikaeinfluss Resistenzen auszubilden. Zur Ermittlung der spontanen Mutationsrate wurde folgender in-vitro-Versuch durchgeführt:
0,1 ml einer Übernachtkultur wurden auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen. Insgesamt wurden 50 Platten beimpft. Parallel dazu wurde von der gleichen Übernachtkultur eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt.
Die Platten wurden bei 37ºC inkubiert und die Anzahl der Kolonien auf den Antibiotikaplatten wurde bestimmt. Die spontane Mutationsrate bei dem jeweiligen Antibiotikum entspricht dem Quotienten aus der Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien und der Anzahl der resistenten Kolonien.
Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine MHK-Bestimmung derjenigen Kolonien durchgeführt, mit denen weitergearbeitet wurde.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der verwendeten Polymerse-Kettenreaktion handelte es sich um ein hochemmpfindliches Verfahren, mit dessen Hilfe Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen werden konnten. 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. Sie sollten eine Länge von ca. 22-24 Basenpaaren und ein ausgeglichenes A-T- und C-G-Verhältnis aufweisen. Vor allem muss darauf geachtet werden, dass die Primer nicht in der Lage sind, Schleifen (Palindrome) oder Dimere mit sich selbst zu bilden. Die Wahl der Sequenzen der Prime erfolgte so, dass sie jeweils komplementär zu den zu untersuchenden gegenläufigen DNA-Strängen waren. Ferner flankierten sie den zu amplifizierenden Bereich und gewährleisteten hierdurch, dass die von der Polymerase synthetisierten DNA-Ketten gegenläufig waren.
Desweiteren werden die vier Desoxynukleotide Adenintriphosphat, Thymintriphosphat, Cytosintriphosphat und Guanintriphosphat zugegeben, aus denen die neuen Nukleotidstränge synthetisiert werden. Die verwendete DNA-Taq-Polymerase stammte aus dem thermophilen Bakterium Thermus auqaticus und war so thermostabil, dass sich ein erneutes Zugeben nach jedem Denaturierungsschritt erübrigte. Das zu untersuchende DNA-Material wurde nicht isoliert, sondern in Form einer Bakterienkolonie zugesetzt. Das Hinzugeben von geeigneten Pufferlösungen und Magnesiumchlorid (von der Taq-Polymerase zur DNA-Strangverknüpfung benötigt) sorgte für ein stabiles Gemsich. Zwei Tropfen Öl verhinderten ein Verdunsten des Ansatzes während der Vorgänge im Thermocycler.

Die PCR an sich wird in 3 Schritte untergliedert:

1. Denaturierung: Dieser Schritt dauert 5 Minuten bei 96ºC. Hierbei wird die DNA-Doppelhelix in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Der zeitliche Umfang dieses Schrittes ließ sich durch die Tatsache begründen, dass ein Zugeben ganzer Bakterienkolonien und nicht etwa isolierter DNA stattgefunden hatte.
2. Amplifizierungszyklus: Er besteht aus:
   a) Denaturierungsphase bei 96ºC
   b) Annealing bei 40-60ºC (Anlagerung der Primer)
   c) Polymerisation bei 72ºC (eigentliche DNA-Synthese)

   Dieser Zyklus wird 25-40 mal wiederholt, pro Zyklus erfolgt eine Verdopplung der DNA-Menge.

3. Polymerisation: Hier werden alle eventuell noch unfertigen Stränge vollendet. Dazu wird die Temperatur von 72ºC für 10 min eingehalten. Die Reaktion läuft im Thermocycler ab, der den Wechsel zwischen den jeweiligen Temperaturen und Haltezeiten automatisch steuert.

Zur Amplifikation der Gene *gyrA, gyrB, parC/grlA* und *grlB/parE* wurden folgende Ansätze verwendet:

Wasser:	32,6 µl
$MgCl_2$-Lösung:	5,0 µl
Puffer-Lösung:	5,0 µl
dNTP-Mix:	2,0 µl
je Primer:	2,0 µl
Taq-Polymerase:	0,6 µl
Zelllysat:	0,8 µl bei *S. aureus* bzw. eine Kolonie von einer frischen Übernachtplatte bei *S. pneumoniae*

Das Temperaturprogramm für die PCR lautete:

Denaturierung	96ºC	5 min
Denaturierung	96ºC	55 sec
Annealing	55ºC (50ºC für *Klebsiella spp*.)	65 sec
Polymerisation	72ºC	70 sec
Endopolymerisation	72ºC	10 min

Die PCR lief über 30 Zyklen.

3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode diente der Überprüfung der Länge des PCR-Produktes, der Abschätzung der DNA-Menge nach der Sequenzierreaktion und dem Erkennen der Fragmentlängen durch einen Argonlaser bei der Sequenzierung.

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 unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Agarosegel. Die Dauer der Auftrennung richtete sich nach der Konzentration des Gels, der Fragmentgröße und der Höhe der angelegten Spannung.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer zum Kochen gebracht und solange gekocht, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Die Gelschlitten wurden in die Gießvorrichtung eingespannt und mit ein oder zwei Slotkämmen versehen. Die aufgelöste Argarose wird mit 20 µl Ethidiumbromid versetzt und blasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Das erkaltete Gel wird in die Gelkammer gegeben. Danach wird die Gelkammer mit soviel TBE-Puffer gefüllt, dass das Gel vollständig bedeckt ist. Zu den Proben aus der PCR bzw. der aufgereinigten PCR werden 4 µl Bluemarker gegeben und anschließend in die Slots pipettiert. Zusätzlich wird ein Slot mit 5 µl eines Molekulargewichtsmerkers versehen und anschließend eine Spannung von 80 V angelegt. Zum Schluss wurde das fertige Gel fotografiert.

Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA-Fragmente und gewährleistet dadurch das Sichtbarwerden der durch die Elektrophorese entstandenen Banden unter UV-Licht. Das im Bluemarker enthaltene Bromphenolblau wandert in der Elektrophorese mit der DNA und zeigt so den Fortschritt der Elektrophorese an. Das ebenfalls enthaltene Glycerin beschwert die Proben und sorgt für deren Verbleiben in der zugehörigen Bahn. Der Molekulargewichtsmarker ist ein synthetisch hergestellter DNA-Marker, der sich in der Elektrophorese nach definierten Molekülgrößen auftrennt. Hierdurch ist bei bekannter geforderter Länge des DNA-Produktes ein Vergleich mit der entsprechenden Bande des Molekulargewichtsmarkers zur Erfolgskontrolle der PCR möglich (z.B. *Enterobacter aerogenes/cloacea*: *gyrA*=273 Bp, *parC*=174 Bp; Pneumokokken: *gyrA*=430 Bp, *gyrB*=495 Bp, *parC*=402 Bp, *parE*= 325 Bp). In folgender Abbildung ist ein Gelbild dargestellt.

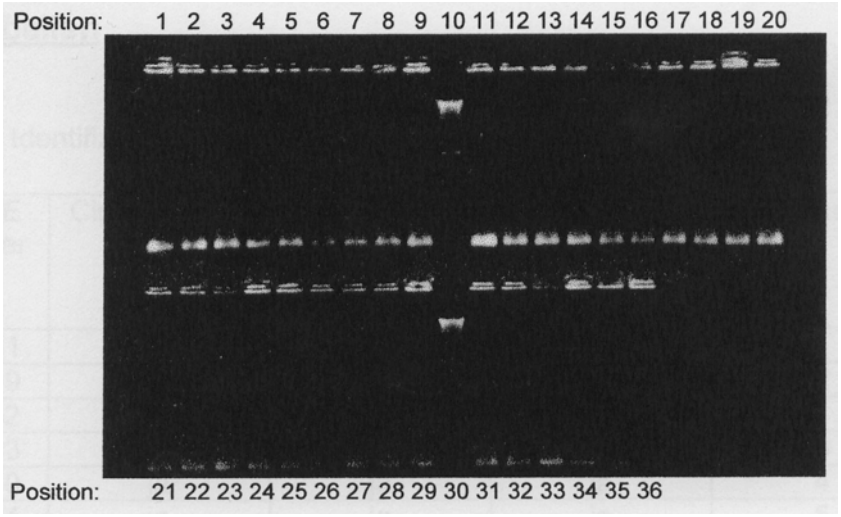


Abbildung 5: Gelbild einer PCR nach erfolgter Elektrophorese (Enterobacter spp.). Die Positionen 10 und 30 beinhalten den 1 Kb DNA-Molekulargewichtsmarker, an Position 30 ist die Blindprobe aufgetragen.

3.2.2.3 Aufreinigung

Nach der PCR wurde das Amplifikat aufgereinigt, um es von Primern, Öl, Nukleotiden, Salzen und Taq-Polymerase zu befreien. Dazu wurde das PCR-Purification-Kit von Quiagen verwendet. Die aufgereinigte DNA kann eingefroren und längere Zeit aufbewahrt werden.

Zunächst fand eine Vermischung von 300 µl PB-Puffer mit dem PCR-Produkt statt. Im nächsten Schritt wurde des entstandenen Gemisches in eine Aufreinigungssäule eingefüllt, die in einem 2 ml großen Sammelgefäß stand. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13 000 rpm wird das Gemisch durch die Säule gezogen und die DNA von den überschüssigen Substanzen befreit. Hierbei erfolgte eine Bindung der DNA an die Membran der Säule, während alle anderen Substanzen im Sammelgefäß zurückblieben. Der Inhalt des Sammelgefäßes wurde nun verworfen, die Aufreinigungssäule in das leere Sammelgefäß zurückgestellt und nach dem Einfüllen von 750 µl Waschpuffer fand ein erneutes Zentrifugieren für 60 sec bei 13000 rpm statt. Nach dem erneuten Verwerfen des aufgefangenen Inhalts gewährleistete ein weiteres Zentrifugieren für 60 sec die vollständige Entfernung des Waschpuffers. Das sich nun anschließende Eintröpfeln von 50 µl 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) in die Mitte der Membran der Säule und das erneute Zentrifugieren von 60 sec diente dem Eluieren der DNA. Ein 1,5 ml Eppendorfcup fing die gereinigte DNA auf.

Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden 4 µl des Eluats mit 4 µl Bluemarker vermischt und auf ein mit 40 µl Ethidiumbroid versetztes 1%iges Gel aufgetragen. Außerdem wurden jeweils 5 µl dreier Molekulargewichtsmarker, die sich in ihrer Konzentration und somit auch in Ihrem DNA-Gehalt voneinander unterschieden mitaufgetragen. Dies gewährleistete einen Vergleich der entstandenen Banden nach der Elektrophorese. Zum einen gab die Höhe der Banden Aufchluss darüber, ob das entstandene DNA-Produkt die geforderte Länge besaß, zum anderen konnte anhand des Helligkeitsvergleichs mit der 1018-Bp-Bande eine Aussage über die Konzentration des PCR-Produkts gemacht werden. Diese Bande wies bei dem am stärksten konzentrierten Marker einen Gehalt von 50 ng/µl, bei dem mittelstark konzentrierten Marker einen Gehalt von 25 ng/µl und bei dem schwach konzentrierten Marker einen Gehalt von 15 ng/µl auf.

Folgende Abbildung enthält ein Gelbild.

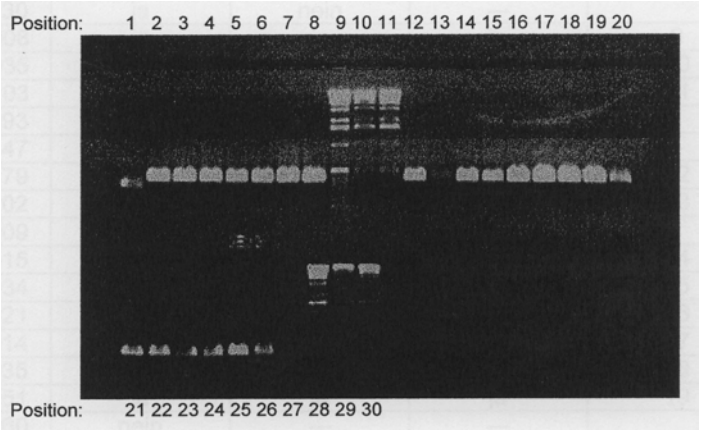


Abbildung 6: Gelbild einer aufgereinigten PCR *(S. pneumoniae)*; die Postionen 9 und 28 zeigen den 1 Kb DNA-Molekulargewichtsmarker, an den Positionen 10 und 29 liegen die mittelstark konzentrierten Marker, und die Positionen 11 und 30 beinhalten den schwach konzentrierten Marker.

3.2.2.4 Sequenzierreaktion

Nach der Aufreinigung schloss 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
- Auqua dest. ad 20 µl

Der Sequenziermix entielt das nötige Pufersystem aus Tris-Puffer und $MgCl_2$ –Lösung, die Taq-Polymerase und farbig markierte dNTP's. Jedes dNTP trug einen anderen Rhodaminmarker. Während der nun folgenden Abläufe im Thermocycler erfolgte die Markierung der DNA, indem die Taq-Polymerase anstelle der Nukleotidmonophosphate die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (Didesoxy A, Didesoxy C, Didesox G und Didesoxy T) einbaute und unmittelbar danach zum Abbruch des DNA-Stranges führte.

Das Temperaturprogramm für die Sequenzierung lautet:

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

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

3.2.2.5 DNA-Fällung

Nach der Sequenzierreaktion erfolgte die Fällung der DNA, die eine Aufbereitung der Proben für die Sequenzierung im Sequenzer beinhaltete. Dazu werden die Proben mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und anschließend in ein mit 250 µl absolutem Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung gefülltes Eppendorfgefäß überführt. Das Gemisch wurde nun 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und 300 µl 70%iges Ethanol in die Eppendorfcups gegeben, um die DNA umzukristallisieren und von überschüssigen Salzen zu befreien. Nach Vortexen wurden die Ansätze nochmals 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Abpipettieren des Alkoholüberstandes und das vollständige Trocknen (an der Luft oder 5 min im Spee-

Vac) der Pellets im Eppendorfcup beendeten die Fällung. In diesem Zustand kann das Reaktionsprodukt einige Zeit tiefgekühlt aufbewahrt werden.

3.2.2.6 Sequenzierung

Der getrocknete Ansatz wurde nun in 0,8 µl einer Mischung aus Formamid und EDTA/ Dextranblau (50 mg/ml DB, 25 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen, die als Ladungspuffer diente und dabei ein Verhältnis von Formamid zu EDTA/DB von 5:1 aufwies. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung für 5 min auf 95ºC erhitzt und verblieben zur Abkühlung auf Eis. Im nächsten Schritt wurden 0,7 µl der DNA-Proben mit einer Pipette auf das vorbereitete Gel im DNA-Sequenzer aufgetragen. Bei dem zwischen zwei ca. 25 x 40 cm großen Glasplatten gegossenen Gel entstand ein ca. 0,4 mm dickes Polyacrylamidgel. Zur Herstellung des Gels erfolgte das Lösen von Harnstoff (nicht über 50ºC erwärmen) in einem Ansatz aus 30%iger Acrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1), TBE-Puffer (10%) sowie H_2O und das anschließende Filtrieren und Entgasen durch einen 0,2 µl Filter. Nun wurde die Lösung in ein 150 ml Becherglas überführt und daraufhin mit 15 µl Temed und 350 µl 10%iger APS-Lösung für die sofort beginnende Polymerisation vermischt. Darauf folgte das Gießen zwischen die vorbereiteten Glasplatten und das Einsetzen eines Kunststoffkammes zur Bildung der Probenschlitze. Die Polymerisation des Gels erstreckte sich über 1-1,5 Stunden in horizontaler Lage, bis das fertige Gel in den Sequenzer gestellt werden konnte. Nach dem Einfüllen der 10%igen TBE-Pufferlösung in die Pufferkammern konnte die Elektrophorese beginnen. Nach deren Beendigung erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Argonionenlasers, wobei mehrere drehbare Spiegel den Laserstrahl auf das Elektrophoresegel richteten und einige Linsen den Strahl fokussierten. Ein Spiegel richtete den Laserstrahl in einem 95º Winkel auf das Gel. Mehrere Linsen sammelten die vorhandene Fluoreszenzanregung der Didesoxynukeotide und leiteten diese nach Filterung und nochmaliger Fokussierung zu einem Spektrographen weiter. Dieser trennte das Licht nach der Wellenlänge auf und leitete es zu der „Charged Coupled Devive (CCD) Camera“ welche die Lichtintensität untersuchte. Die Software des angeschlossenen Computers enthielt die Informationen über die verwendeten Dye-Terminatoren und Ihre Emissionsmaxima und wandelte hierdurch das Lichtsignal in ein digitales Signal um und verarbeitete es. Durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe erschienen die vier Basen nach der graphischen Verarbeitung als grüne, blaue, rote und schwarze Wellenlinien, aus denen die Sequenz der untersuchten DNA abzulesen war. Didesoxy A erschien grün, Didesoxy C blau, Didesoxy G schwarz und Didesoxy T rot.

3.2.2.7 Pulsgelfeldelektrophorese

Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Fragmente zwischen 200 und 12000 kb aufgetrennt werden. Bei der PFGE wurde ein multidirektionales Feld mit wechselnden Polen und Pulsen unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Die DNA-Fragmente orientierten sich nach der Richtung des Feldes und wanderten in einer ausgestreckten mobilen Konformation. Durch das gerichtete Umschalten der elektrischen Felder, die in einem Winkel von 120º zueinander standen, änderten die DNA-Moleküle ihre Richtung im Gel. Durch die wechselnde Stromrichtung orientierte sich das DNA-Molekül im elektrischen Feld ständig neu, um wieder eine mobile Konformation annehmen zu können. Dies ermöglichte eine Wanderung auch großer DNA-Moleküle durch das Agarosegel. Große Moleküle benötigten für die durch das Wechselfeld induzierten Konformationsänderungen mehr Zeit als kleine Moleküle, um sich in Feldrichtung zu orientieren. Wenn die Reorientierung kürzer als die Pulszeit war, kam es zu einer Vorwärtsbewegung. Demnach verblieb mit zunehmender Molekülgröße immer weniger Zeit zur Wanderung in Feldrichtung; daraus folgte die bei der PGFE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht der linearen DNA-Moleküle. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Makrorestriktionsverdaus wird vom elektrischen Feld, von der Pulszeit vom Winkel und der Konfiguration des elektrischen Feldes, der Temperatur und Ionenstärke des Gels und des Puffers sowie von der Spezifikation und Konzentration der Agarose bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendete Pulstechnik bezeichnet man als Contour-Clamped-Homogenous-Electric-Field-Electrophoresis. In diesem System waren 24 Elektroden horizontal auf einem hexagonalen Rahmen in der Elektrophoresekammer angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden machte graduell abfallende Potentiale möglich, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut werden konnte. Alle aufgeführten Parameter sind beim Gene-Path-Strain-Typing-System (BioRad) standardisiert vorgegeben. Die Durchführung des genauen Arbeitsablaufs und die Reaktionsbedingungen sowie die visuelle Auswertung der entstandenen Bandenmuster erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Auswertung der Gele verwendeten wir den GelCompar® (UPGMA).

4 Ergebnisse

Die klassische Behandlung der häufig vorkommenden Infektionskrankheiten durch *S. pneumoniae, S . aureus* und *Enterobacteriaceae* mit Antibiotika wird zunehmend durch die Ausbildung und Verbreitung resistenter Stämme limitiert. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Methicillin-resistenten *S. aureus* sowie den Penicillin-resistenten Pneumokokken zu, weil verbunden mit diesen Resistenztypen das Vorkommen von Multiresistenzen recht häufig zu beobachten ist (Schmitz *et al.*, 1998; Tomasz, 1997). Diese Arbeit soll unter anderem einen Überblick geben über die Aktivität von Chinolonen, die Resistenzausbreitung und über häufige Resistenzmechanismen, um dem therapierenden Arzt bei der Auswahl des richtigen Antibiotikums Hilfestellung zu leisten.
Verantwortlich für die Resistenz gegenüber Chinolonen scheinen hauptsächlich Mutationen in den Genen der Zielstrukturen, nämlich der Gyrase und der Topoisomerase IV zu sein. Diese Resistenzen sind in den QRDR der Gene *gyrA, gyrB, parC (grlA)* und *parE (grlB)* an den sogenannten „hot spots“ um Codon 80 lokalisiert (Heisig, 1997). Einige Stämme zeigen zusätzlich eine gesteigerte Expression von Efflxpumpen, *NorA* bei Staphylokokken und Pmr bei Pneumokokken, die verstärkend auf die Resistenzentwicklung einwirken, da sie den Abtransport der Chinolone aus der Bakterienzelle ermöglichen (Kaatz *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1999). Zunächst wird eine Zusammenfassung über die Ausbreitung und Verteilung resistenter Stämme gegeben, anschließend erfolgte ein Vergleich verschiedener Fluorchinolone mit dem neuen Disfluorochinolon BMS-284756, vor allem die Aktivität und den Einfluss der Resistenzmutationen betreffend.

4.1 Epidemiologische Resistenzverteilung

4.1.1 Staphylococcus aureus

1548 *S. aureus*-Stämme, darunter 369 Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) aus diversen europäischen Universitätskliniken wurden hinsichtlich ihrer MHK-Werte von Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Trovafloxacin untersucht. In Abbildung 7 ist beispielhaft eine Mikrotiterplatte dargestellt, wie sie bei den MHK-Bestimmungen zur Anwendung kam.

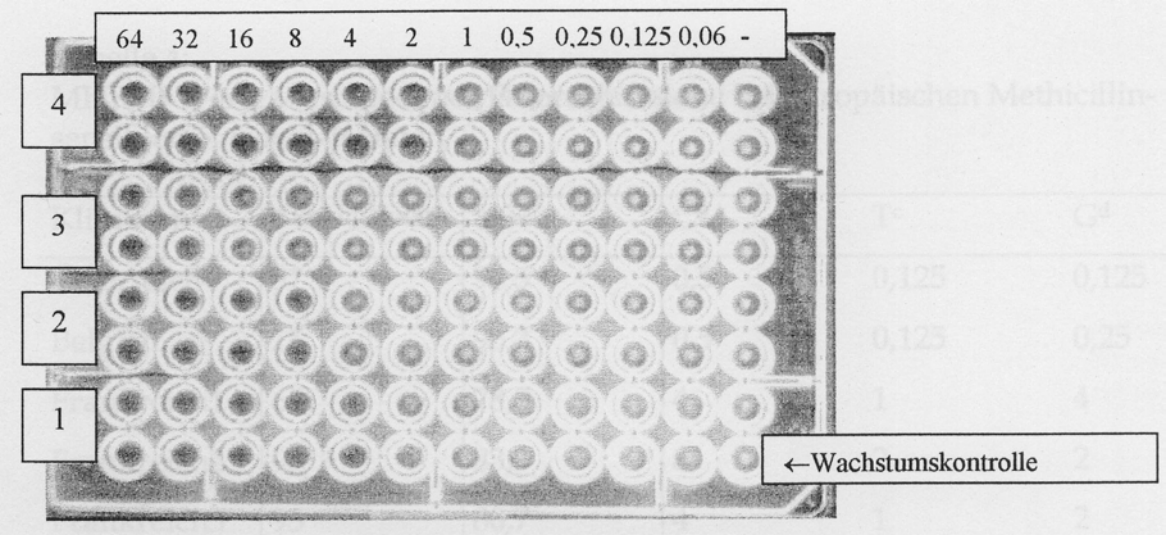


Abbildung 7: Darstellung einer Mikrotiterplatte, die eine Verdünnungsreihe von 64 mg/l – 0,06 mg/l für Ciprofloxacin enthält. Es erfolgte die Bestimmung der MHK-Werte von 4 (1-4*) S. aureus*-Isolaten. Die Reihe ganz rechts enthält die Wachstumskontrolle. Das Wachstum von Bakterien wurde als weißer Punkt am Boden der Vertiefungen sichtbar. Hier ergeben sich folgenden MHK-Werte: Stamm 1: 2 mg/l; Stamm 2: 8 mg/l; Stamm 3: 32 mg/l; Stamm 4: 2 mg/l.

Zur Beurteilung der Unterschiede der Resistenzraten in den einzelnen Ländern wurden die MHK90- und die MHK50-Werte errechnet. Darunter versteht man die MHK-Werte, bei denen 50% bzw. 90% aller Isolate abgetötet wurden. 369 der insgesamt 1548 Stämme erwiesen sich als Methicillin-resistent, wovon lediglich 10% sensibel gegenüber Ciprofloxacin waren; folglich konnte hier keine Differenz in der Resistenzrate im Ländervergleich festgestellt werden.

87% der 1179 Methicillin-sensiblen Isolaten waren empfindlich auf Ciprofloxacin. Trovafloxacin und Gatifloxacin wiesen mit einem MHK90-Wert von 1 mg/L vergleichbare Aktivitäten auf, wobei Ciprofloxacin mit einer MHK90 von 2 mg/L weniger aktiv war. Geografisch betrachtet konnte man ein vermehrtes Auftreten chinolonresistenter Stämme in Italien, Portugal, Frankreich, Großbritannien und teilweise in Spanien beobachten. Der Aktivitätsunterschied zwischen den einzelnen Chinolonen stellte sich jedoch in jedem Land gleich bleibend dar.

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der Ergebnisse und in Abbildung 8 erkennt man den Zusammenhang zwischen MHK90-Wert und Herkunft des Isolates.

Klinikum	Anzahl Isolate	% S[a]	MHK_{90} C	MHK_{90} T	MHK_{90} G
Österreich	57	96,5	0,5	0,125	0,125
Belgien	15	93,3	0,5	0,125	0,25
Frankreich 1	65	78,5	4	1	4
Frankreich 2	96	83,3	8	2	2
Frankreich 3	93	80,7	4	1	2
Frankreich 4	78	80,7	4	1	2
Deutschland 1	65	98,5	0,25	0,06	0,125
Deutschland 2	110	94,6	0,5	0,06	0,125
Griechenland	57	91,2	1	0,125	0,25
Italien 1	47	80,9	4	1	2
Italien 2	26	80,8	8	2	2
Niederlande	42	100	0,25	0,06	0,125
Polen 1	21	95,2	0,25	0,06	0,06
Polen 2	44	97,7	0,25	0,125	0,125
Portugal	68	88,2	4	1	2
Spanien 1	52	57,7	16	4	4
Spanien 2	55	92,7	0,25	0,06	0,125
Spanien 3	49	89,8	2	0,25	0,25
Schweiz	54	90,7	0,5	0,125	0,125
UK	85	84,7	4	1	2
Gesamt	1179	86,7	4	1	1

Legende Tabelle
%Sa : Anteil Ciprofloxacin-sensibler Isolate
MHK_{90} C: MHK_{90}-Werte für Ciprofloxacin
MHK_{90} T: MHK_{90}-Werte für Trovafloxacin
MHK_{90} G: MHK_{90}-Werte für Gatifloxacin

Tabelle 4: MHK90-Werte diverser Fluorochinolone bei Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten aus Europa

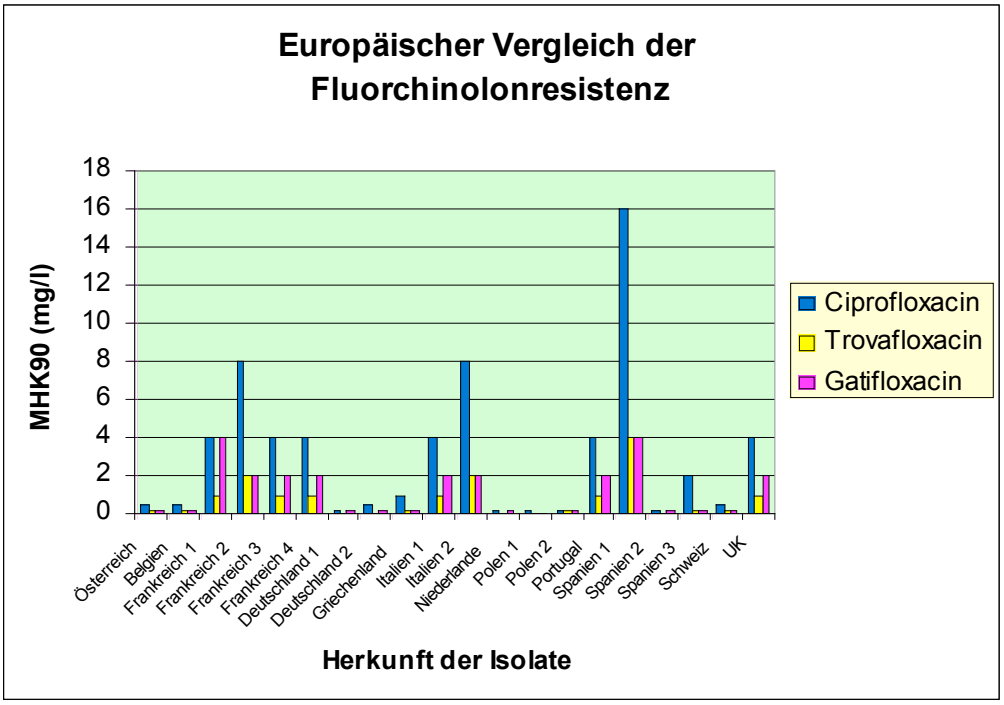


Abbildung 8: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Fluorochinolonresistenz und Herkunft des Isolates. Es erfolgte der-Vergleich der MHK90-Werte. Als MHK90 bezeichnet man die minimale Hemmkonzentration, bei der 90% aller Isolate einer Gruppe inhibiert werden.

Die Vermutung, dass die Chinolon-Resistenz als Multiresistenz zur Methicillin-Resistenz ein durchaus ernstzunehmendes Problem für die MRSA-Therapie darstellt, wird durch das hohe Aufkommen Ciprofloxacin-resistenter MRSA zusätzlich bekräftigt. Die deutlich feststellbaren Divergenzen der länderspezifischen Resistenzraten können zum einen im unterschiedlichen Gebrauch der Antibiotika und zum anderen in der raschen klonalen Ausbreitung eines MRSA nach dessen Auftreten in einer Klinik begründet sein. Das Vorkommen von Resistenzen gegenüber Chinolonen ist meist zwar noch relativ gering, besorgniserregend ist jedoch, dass in Einzelfällen Resistenzraten von bis fast 20% beobachtet wurden.

4.1.2 Streptococcus pneumoniae

Im Gegensatz zu Staphylokken sind die Resistenzen gegenüber Chinolonen bei *S. pneumoniae* noch nicht so weit verbreitet. Zur Erfassung der derzeitigen Resistenzlage erfolgte die MHK-Wert-Bestimmung von 1191 Pneumokokken-Isolaten für Ciprofloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin und Geprafloxacin.

Basierend auf dem im Jahre 1999 von Chen *et al.* festgelegten Grenzwert von ≥ 4 µg/ml für Ciprofloxacin wiesen 1,8%, nämlich 21 der 1191 Isolate, eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin auf. In Tabelle 5 ist die genaue Verteilung der MHK-Werte dargestellt, eine grafische Zusammenfassung der MHK-90-Werte ist in Abbildung 9 gegeben.

MHK (mg/l)	Anzahl Isolate mit MHK X	Prozent Isolate mit MHK X	Kumulativer Prozentsatz
Ciprofloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥4 mg/l		
≤0,005	3	0,3	0,3
0,03	1	0,1	0,4
0,06	2	0,2	0,6
0,125	10	0,8	1,4
0,25	39	3,3	4,7
0,5	417	35	39,7
1	574	48,2	87,9
2	124	10,4	98,3
>2	21	1,8	100
Levofloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥8 mg/l		
≤0,5	440	36,9	36,9
1	696	58,4	95,3
2	51	4,3	99,6
4	3	0,3	99,9
>4	1	0,1	100

Sparfloxacin (469 Isolate)			
≤0,125	82	17,5	17,5
0,25	202	43,1	60,6
0,5	176	37,5	98,1
1	9	1,9	100
Gatifloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥4 mg/l		
≤0,03	11	0,9	0,9
0,06	10	1,6	2,5
0,125	327	27,5	30
0,25	703	59	88,9
0,5	126	10,6	99,5
1	3	0,3	99,8
2	1	0,1	99,9
4	0	0	99,9
>4	1	0,1	100
Trovafloxacin			
≤0,03	45	3,8	3,8
0,06	260	21,8	25,6
0,125	455	38,2	63,8
0,25	328	27,5	91,3
0,5	101	8,5	99,8
1	1	0,1	99,9
2	0	0	99
4	1	0,1	100
Grepafloxacin (722 Isolate)			
≤0,125	442	61,2	61,2
0,25	248	34,3	95,5
0,5	25	3,5	99
1	5	0,7	99,7
>1	2	0,3	100

Tabelle 5: Verteilung der MHK-Werte diverser Fluorochinolone bei Pneumokokken

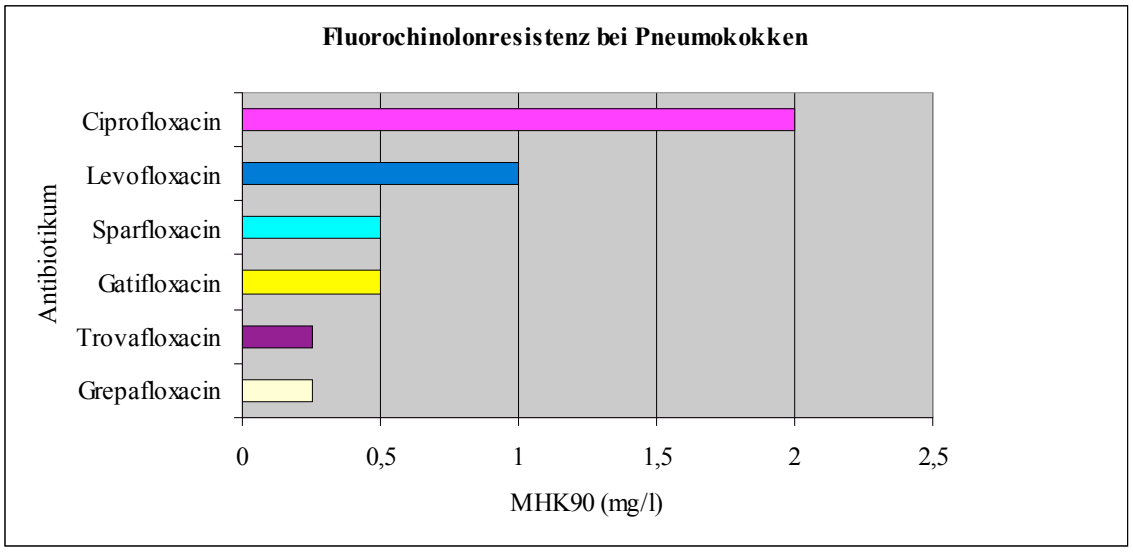


Abbildung 9: Vergleich der MHK90-Werte der getesteten Fluorchinolonantibiotika. Unter MHK90 versteht man den MHK-Wert, bei dem 90% aller Isolate gehemmt werden.

Zusammenfassend zeigte sich eine insgesamt geringe Anzahl Ciprofloxacin-resistenter Isolate unter den Pneumokokken. Da die Resistenzrate bei anderen Chinolonen noch geringer ausfällt, kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzgruppe zur Therapie bei Pneumokokkeninfektionen noch bedenkenlos verwendet werden kann. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Infektionen mit *S. pneumoniae* meist ambulant erworben sind, denn die Resistenzausbreitung in Kliniken verläuft wesentlich schneller.

4.1.3 Enterobacteriaceae

Obwohl Harnwegsinfektionen hervorgerufen durch *Klebsiella pneumoniae* erfolgreich mit Fluorchinolonen behandelt werden, konnten in letzter Zeit Stämme mit herabgesetzter Empfindlichkeit gegenüber dieser Substanzgruppe nachgewiesen werden (Deguchi *et al.*, 1997). Der hauptsächliche Resistenzmechanismus in gramnegativen Keimen, der für diese Entwicklung verantwortlich gemacht werden kann, ist eine Alteration der *gyrA*-Untereinheit der DNA-Gyrase. Veränderungen der Untereinheit *parC* der Topoisomerase scheint nur eine untergordnete Rolle zu spielen (Deguchi *et al.*, 1997), ebenso wie Veränderungen der Außenmembranproteine (Georgopoulos *et al.*, 1998). Die Resistenzentwicklung bei *Enterobacteriaceae* ist besonders besorgniserregend im Hinblick auf die Therapie und Prognose von Sepsen und post-operativen Infektionen des unteren Gastrointestinaltraktes. So betrug die Resistenzrate gegenüber Ciprofloxacin in einer japanischen Studie 61,1% für *E. coli* und 16,6% für *K. pneumoniae* (Nakamura *et al.*, 2005). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ein vermehrter Einsatz von Fluorchinolonen mit dem häufigeren Auftreten resistenter *Enterobacteriaceae*-Isolate assoziiert ist (Bolon *et al.,* 2004).

Aus einer im Jahre 2001 veröffentlichten Studie ist ersichtlich, dass die Empfindlichkeit von Enterobakterien gegenüber der Nalidixinsäure zwischen 1992 und 1998 unverändert blieb mit 86% versus. 85% (Robert *et al.*, 2001). Bezogen auf die jeweiligen Spezies war eine reduzierte Empfindlichkeit von *E. coli* (89% versus 83%) sowie *E. cloacae* (87% versus 82%) erkennbar, wohingegen eine gesteigerte Empfindlichkeit von *K. pneumoniae*-Isolaten (74% versus 83%) nachgewiesen werden konnte. Diese Entwicklung wurde der verstärkten Überwachung und Kontrolle der Ausbreitung von beta-Laktamase-produzierenden *K. pneumoniae*-Stämmen mit erweitertem Spektrum (ESBL) zugeschrieben. Die durchschnittliche Empfindlichkeitsrate von *Enterobacetriaceae* gegenüber Fluorchinolonen blieb ausreichend hoch, im Falle von Ciprofloxacin betrug sie über 90% (Robert *et al.*, 2001)

Eine Studie von Kirby *et al.* aus dem Jahre 2002 ergab, dass Enterobakterien-Isolate aus dem SENTRY-Programm ähnliche Empfindlichkeitsraten gegenüber den vier Chinolonen Ciprofloxa-

cin, Levofloxacin, Gatifloxacin und BMS-284756 aufwiesen. Diese lauteten 85,8 – 87,0% für *E.coli*, 90,8 – 94,3% für *Enterobacter spp.* und 89,8 – 95,2% für *Klebsiella spp.*, wobei Ciprofloxacin am wirksamsten war. Die Resistenzentwicklung hatte die größten Ausmaße in Lateinamerika für *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae*. Das Auftreten von beta-Laktamase-produzierenden Stämmen mit erweitertem Spektrum konnte hingegen in allen drei untersuchten Regionen, nämlich Lateinamerika, Europa und Nordamerika) dokumentiert werden (Kirby *et al.,* 2002). Dashti *et al.* kamen kürzlich zu dem Ergebnis, dass 46,4% der untersuchten beta-Laktamase-produzierenden *Klebsiella pneumoniae*-Stämme mit erweitertem Spektrum resistent gegenüber Ciprofloxacin waren, 15,9% waren intermediär resistent und 37,7% waren sensitiv (Dashti *et al.,* 2006).
Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Sammlung von 501 *Enterobacter-spp*.-, 465 *K. pneumoniae*- und 148 *K. oxytoca*-Isolaten, wobei 10,8 % der *Enterobacter-spp*.-, 4,7 % der *K. pneumoniae*- und 2,8% der *K. oxytoca*-Stämme eine intermediäre oder komplette Resistenz gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen (MHK-Wert > 1 µg/ml).

4.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen

Die verschiedenen Resistenzmutationen zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf derzeit verwendete Chinolone, die neuesten sollen hier in ihrer Aktivität verglichen werden. Die QRDR der *gyrA, gyrB, parC* und *parE* Gene wurden sequenziert, um den Einfluss der bekannten Resistenzmutation an der Ausbreitung der Resistenz zu detektieren. Desweiteren wurde durch zusätzliche Untersuchung des MHK-Wertes unter Reserpin-Einfluss die Beteiligung von Effluxpumpen an der Resistenzausbildung aufgezeigt.

4.2.1 S. aureus

Vergleich der Aktivität der getesteten Chinolone

Die MHK-Werte von 7 Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Clinafloxacin) gegenüber 434 Methicilin-sensiblen (MSSA) und 457 Methicillin-resistenten (MRSA) *S. aureus*-Isolaten wurden bestimmt. Die MHK90-Werte wurden gemessen und bei Ciprofloxacin-resistenten Keimen erfolgte die Ermittlung der Ciprofloxacin-MHK außerdem mit Reserpin. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Bei den Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurden außerdem die QRDR von den Genen für die Untereinheiten A der Gyrase und der Toposisomerase IV, nämlich *gyrA* und *grlA* sequenziert.
Generell konnte beobachet werden, dass bei den MSSA die Unterschiede der in-vitro-Aktivität der einzelnen Chinolone geringer waren als bei den MRSA.

Für MSSA zeigten Sitafloxacin, Clinafloxacin und Trovafloxacin die höchste in-vitro-Aktivität mit einer MHK90 von 0,03 mg/l, gefolgt von Moxifloxacin mit einer MHK90 von 0,06 mg/l, Gatifloxacin mit 0,125 mg/l, Levofloxacin mit 0,25 mg/l und abschließend Ciprofloxacin als am wenigsten potente Substanz mit einer MHK90 von 0,5 mg/l. Wurden 99,8% aller MSSA von 1mg/l Sitafloxacin abegetötet, so sank dieser Wert auf 96,3% bei Ciprofloxacin.

Auch bei den MRSA erwies sich Sitafloxacin als die wirksamste Substanz. Es zeigte sich, dass es doppelt so aktiv wie Clinafloxacin und mindestens achtmal so aktiv wie die übrigen Fluorchinolone war. Die MHK-Werte für Sitafloxacin, Clinafloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin, Trovafloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin lauteten in entsprechender Reihenfolge: 0,5 mg/l, 1 mg/l, 4 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l und >16 mg/l. Von den 457 untersuchten MRSA erwiesen sich 95,7% als resistent gegenüber Ciprofloxacin, 55,4% gegenüber Levofloxacin, 44,4% gegenüber Gatifloxacin und Trovafloxacin und 27,1% gegenüber Moxifloxacin, wohingegen sich nur 0,4% als resistent gegenüber Clinafloxacin und 0,2% gegenüber Sitafloxacin herausstellten. Der Grenzwert wurde bei 4 mg/l veranschlagt.

Ingesamt konnten also 433 Isolate als Ciprofloxacin-resistent angesehen werden, diese setzten sich aus 420 MRSA- und 13 MSSA-Stämmen zusammen. Beim Einsatz von Reserpin kam es bei 139 (30,3%) Isolaten zu bis zu vierfach niedrigeren MHK-Werten für Ciprofloxacin, wobei die übrigen Isolate unbeeinflusst blieben. Es ist also in 30,3% der Fälle ein Mitwirken der Effluxpumpe *NorA* auf die Resistenzentwicklung anzunehmen.

Die anschließende Sequenzierung der 433 Isolate auf ihre „Quinolone-determining regions“ in *gyrA* und *grlA* erfolgte nach der bereits in Kapitel 3.2.2.6 beschriebenen Methoden. Folgende Amplifikatlängen wurden bei der vorhergehenden PCR-Amplifikation erwartet: *gyrA*: 222 bp; *grlA*: 458 bp.

Auf Abbildung 10 ist ein Agarosegel einer *gyrA*- und einer *grlA*-PCR dargestellt.

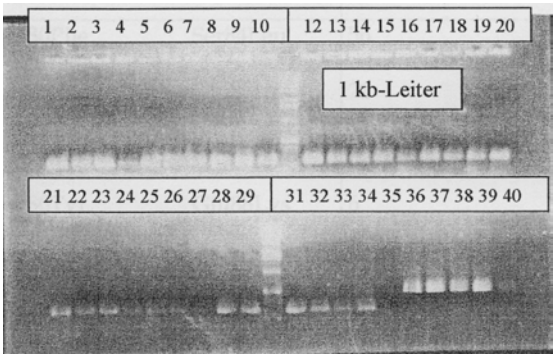


Abbildung 10: Agarosegel mit PCR-Produkten der Amplifikation der QRDRs von *gyrA* und *grlA*.. Dargestellt sind die PCR-Produkte der *S. aureus*-Isolate MRSA 432-457 für *gyrA* („slot“ 1-34) sowie MSSA 1-4 für *grlA* („slot 36-39). Die Negativkontrollen befinden sich in den „slots“ 35 und 40. Die PCR erfolgte unter den beschriebenen Bedingungen und es wurden jeweils 8 µl des PCR-Produktes mit 4 µl Gelladepuffer aufgetragen. Die DNA-Fragmente wiesen die erwarteten Längen auf.

Nach der Amplifikation wurde eine Aufreinigung der PCR-Fragmente durchgeführt, deren Agarosegel zur Kontrolle in Abbildung 11 gezeigt wird.

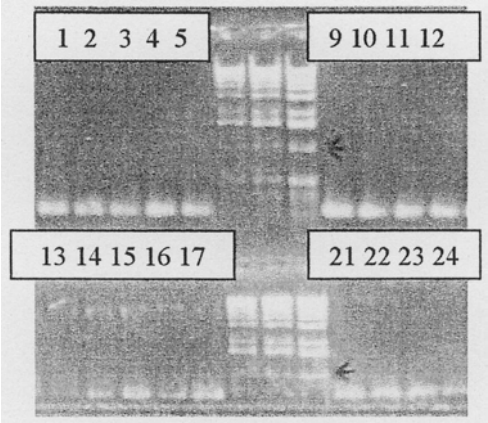


Abbildung 11: Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Fragmente der Isolate MRSA 1-9 für *gyrA* und *grlA*. Obere Reihe („slots" 1-12): *gyrA*. Untere Reihe („slots" 13-24): *grlA*. Es wurden 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 4 µl Gelladepuffer aufgetragen. Die kb-Marker dienten der Mengenbestimmung der DNA in der Aufreinigung. Dabei wurde die Helligkeit mit der 1018-bp-Bande (Pfeil) verglichen.

Sequenzierung von QRDRs bei *gyrA* und *grlA*

In *gyrA* konnten vier einzelne Mutationen gefunden werden: *Ser84Leu, Ser 84Lys, Glu88Lys* und *Glu88Val*. In *grlA* fielen hingegen sechs verschiedene einzelne oder kombinierte Mutationen auf: *Ser80Phe, Ser80Tyr, Glu84Lys, Ala116Glu, Ala116Pro* und die Kombination von *Ser80Phe* mit *Glu84Val*. In Abbildung 12 sind die Häufigkeiten der jeweils ermittelten Mutationskombinationen aufgeführt.

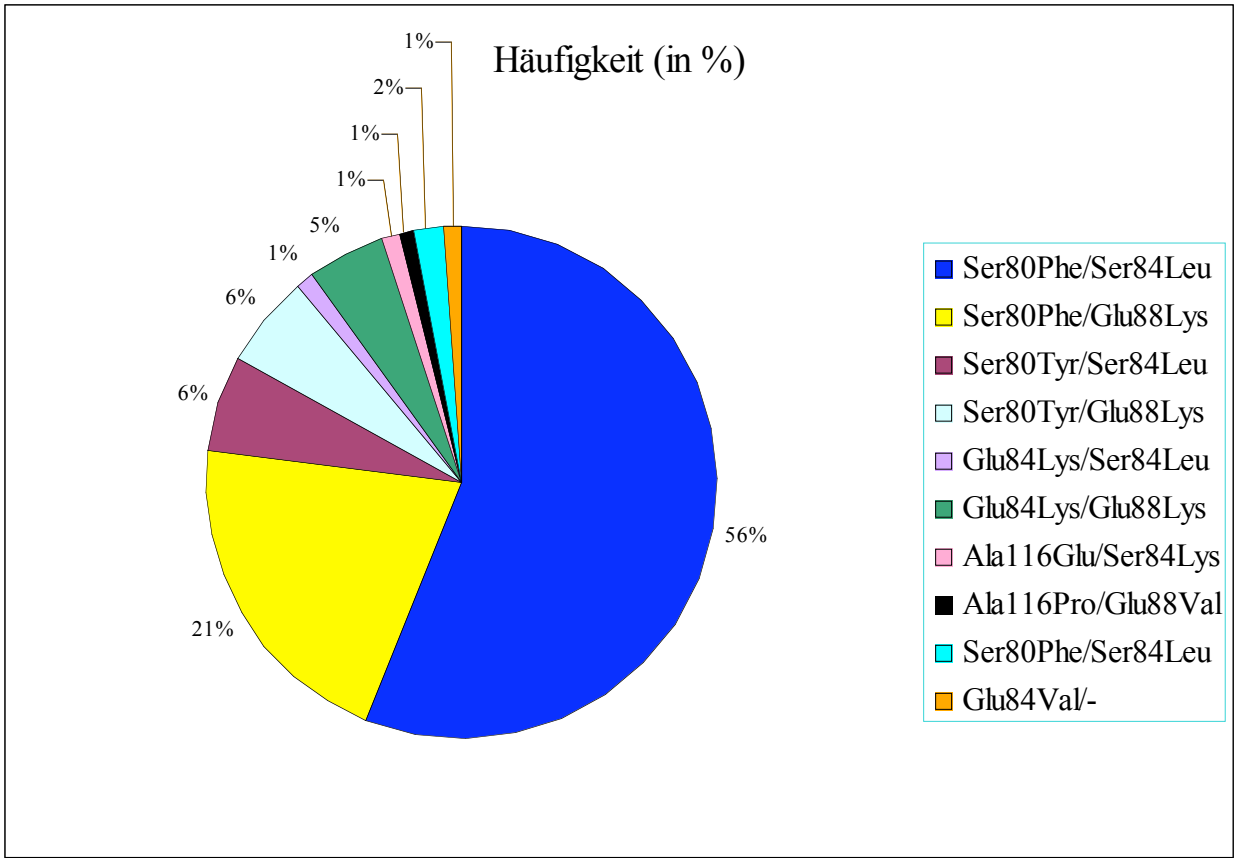
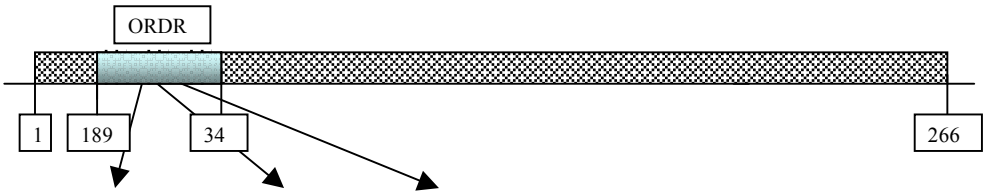


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Häufigkeiten der ermittelten Mutationskombinationen

In Abbildung 13 ist die Lage der Mutationen im Gen dokumentiert.

a) Mutationen im Gen *gyrA* (Gyrase Untereinheit A)



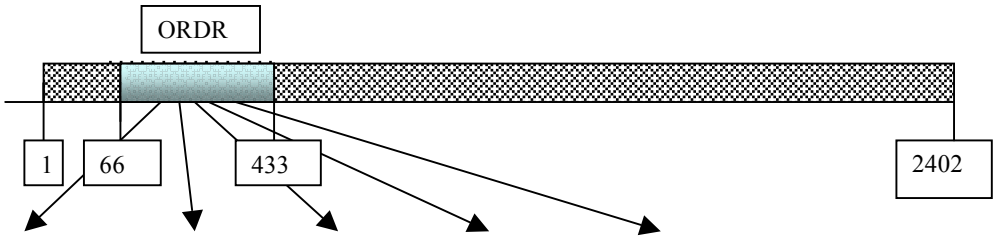
250 C→T	261 G→A	262 A→T
Ser→Leu	Glu→Lys	Glu→Val
Codon 84	88	88

QRDR:
159
aat gaa caa ggt atg aca ccg gat aaa tca tat aaa aaa tca gca cgt atc gtt ggt gac gta atg ggt aaa tat
N E Q G M T P D K S Y K K S A R I V G D V M G K Y
cac cct cat ggt gac tca tct att tat gaa gca atg gta cgt atg gct caa gat ttc agt tat cgt tat ccg ctt gtt
H P H G D S S I Y E A M V R M A Q D F S Y R Y P L V
gat ggc caa ggt aac ttt ggt tca atg gat gga gat ggc gca gca gca atg cgt tat act gaa gcg cgt a
D G Q G N F G S M D G D G A A A M R Y T E A R

381

Primer
Mutationsorte
Beginn/Ende QRDR

b) Mutationen im Gen *grlA* (Topoisomerase IV-Untereinheit A)



238C→T/A	249G→A	250A→T	345G→C	346C→A
Ser→Phe/Tyr	Glu→Lys	Glu→Val	Ala→Pro	Ala→Glu
Codon 80	84	84	116	116

QRDR:
26
a ctt gaa gat gtt tta gtt gat cgc ttt gga aga tat agt aaa tat att att caa gag cgt gca ttg cca gat gtt
L E D V L G D R F G R Y S K Y I I Q E R A L P D V
cgt gat ggt tta aaa cca gta caa cgt cgt att tta tat gca atg tat tca agt ggt aat aca cac gat aaa aat ttc
R D G L K P V Q R R I L Y A M Y S S G N T H D K N F
cgt aaa agt gcg aaa aca gtc ggt gat gtt att ggt saa tat cat cca cat gga gac tcc tca gtg tac gaa gca
R K S A K T V G D V I G Q Y H B H G D S S V Y E A
atg gtc cgt tta agt caa gac tgg aag tta cga cat gtc tta ata gaa atg cat ggt aat aat ggt agt atc gat
M V R L S Q D W K L R H V L I E M H G N N G S I D
aat gat ccg cca gcg gca atg cgt tac act gaa gct aag tta agc tta cta gct gaa gag tta tta cgt gat att
N D P P A A M R Y T E A K L S L L A E E L L R D I
aat aaa gag aca gtt tct ttc att cca aac tat gat gat acg aca ctc gaa cca atg gta ttg cca tca aga ttt
N K E T V S F I P N Y D D T T L E P M V L P S R F
cct aa
P

484

Abbildung 13: Lage der Quinolone Resistance Determining Region im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *grlA*..

Als deutlich häufigste Mutationskombination kann also *Ser84Leu* in *gyrA* und *Ser80Phe* in *grlA* ausgemacht werden, gefolgt von *Glu88Lys* in *gyrA* und *Ser80Phe* in *grlA*.

Generell kann gesagt werden, dass die neuen Fluorchinolone sich als wesentlich aktiver gegenüber Staphylokokken erwiesen als die älteren Präparate. Da dies auch bei Ciprofloxacin-resistenten Isolaten der Fall war, kann angenommen werden, dass die neueren Fluorchinolone weniger von bestehenden Resistenzmutationen beeinflusst wurden. Die geringe Varianz der auftretenden Mutation ist ein Hinweis darauf, dass eine konale Ausbreitung resistenter Stämme eher für eine steigende Resistenzentwicklung verantwortlich ist als die Neuentstehung resistenter Stämme.

4.2.2 S. pneumoniae

Vergleich der Aktivität der getesteten Chinolone

Wir bestimmten die MHK-Werte von 427 Pneumokokken-Isolaten gegenüber Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin. Die Ciprofloxacin-MHK-Werte wurden außerdem nochmals unter Anwesenheit von Reserpin ermittelt, um den Einfluss der Effluxpumpe zu untersuchen. Die Bestimmungen wurden dreimal wiederholt.

Alle 25 Stämme, bei denen eine erhöhte MHK für Ciprofloxacin (≥ 4mg/l) nachgewiesen werden konnte, wurden einer Untersuchung auf Veränderungen den ORDR von *gyrA, gyrB, parC* und *parE* unterzogen. Die Amplifizierung der QRDR dieser Isolate erfolgte mittels PCR, die erwarteten Produktlängen hierfür lauteten 381 bp für *gyrA*, 414 bp für *gyrB*, 310 bp für *parC* und 289 bp für *parE.* Anschließend wurde die Aufreinigung der PCR-Produkte durchgeführt. In Abbildung 14 ist beispielhaft ein Agarosegel einer solchen PCR und in Abbildung 15 ein Aufreinigungsgel dargestellt.

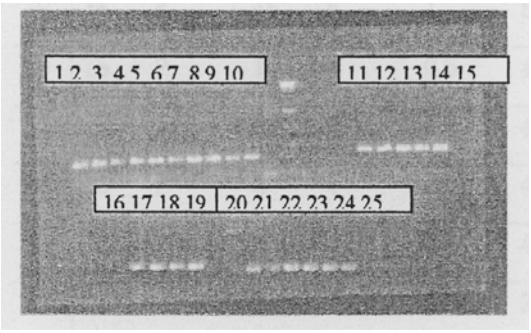


Abbildung 14: Agarosegel mit Darstellund der PCR-Produkte der QRDR der Stämme 1-10 für *gyrA* (Banden 1-10) und 1-6 für *parE* (Banden 20-25) sowie der Stämme 1-7 für *gyrB* (Banden 16-19). Die PCR-Produkte wiesen die erwarteten Längen auf.

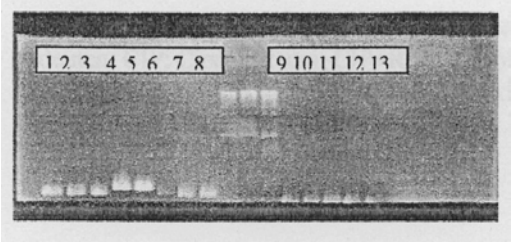


Abbildung 15: Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Produkte.
Banden 1-3: Isolat 1-3*, gyrA*.
Banden 4-5: Isolat 1-2, *gyrB.*
Banden 6-8: Isolate 1-3, *parC.*Proben 9-13: Isolat 1-5, *parE.*

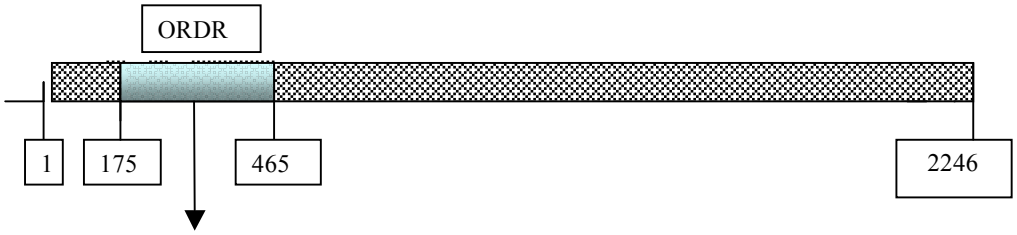
Tabelle 7 zeigt die gefundenen Mutationen bezogen auf das jeweilige Isolat.

Nr.	CIP	CIP+RES	LEV	TRO	CLIN	GAT	MOX	SIT	GEM	*gyrA*	*parC*	*gyrB*	*parE*
1	4	1	2	0,25	0,125	0,5	0,25	0,06	0,06	-	-	-	Ile460Val
2	4	4	1	0,125	0,125	0,5	0,125	0,06	0,125	-	-	-	Ile460Val
3	4	1	2	0,5	0,125	0,5	0,25	0,06	0,125	-	-	-	-
4	4	2	2	0,25	0,125	0,5	0,25	0,06	0,06	-	-		Ile460Val
5	4	4	1	0,25	0,06	1	0,25	0,06	0,06	-	-	-	-
6	4	2	4	1	0,25	2	1	0,125	0,125	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
7	4	1	2	1	0,125	0,5	0,25	0,06	0,125	-	-	-	Ile460Val
8	4	2	2	0,125	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	-	-	-	Ile460Val
9	4	4	4	1	0,25	2	1	0,125	0,125	Ser81Tyr	Ser79Phe	-	Ile460Val
10	4	1	4	0,25	0,25	2	1	0,125	0,25	Ser81Phe	Asp83Asn	-	-
11	4	2	8	0,5	0,5	4	2	0,25	0,5	Ser81Tyr	Asp83Asn	-	Ile460Val
12	4	4	2	0,25	0,125	0,5	0,5	0,25	0,25	-	-	-	Ile460Val
13	4	4	1	0,125	0,125	0,5	0,25	0,125	0,125	-	-	-	-
14	8	1	8	4	0,5	4	2	0,125	0,25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
15	8	2	4	0,5	0,25	2	1	0,25	0,25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
16	16	4	8	4	0,5	4	2	0,25	0,5	Ser81Tyr	Asp83Asn	-	Ile460Val
17	16	8	8	4	0,5	4	2	0,25	0,25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	-
18	16	8	16	8	0,5	8	4	0,5	0,5	Ser81Tyr	Asp83Asn	-	Ile460Val
19	16	4	16	8	1	8	4	0,5	0,5	Ser81Phe	Asp83Asn	-	Ile460Val
20	16	2	16	4	0,5	4	2	0,25	0,25	Ser81Tyr	Ser79Phe	-	-
21	16	4	8	2	1	4	2	0,5	0,5	Ser81Phe	Ser79Phe	-	-
22	16	8	8	4	0,5	4	2	0,25	0,2	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
23	32	16	8	4	0,5	4	2	0,25	0,5	Ser81Tyr	Ser79Phe	-	Ile460Val
24	32	8	8	2	0,5	2	2	0,25	0,25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
25	32	2	8	4	0,5	4	2	0,25	0,5	Ser81Tyr	Asp83Asn	-	Ile460Val

Tabelle 7: Mutationen und MHK-Werte bei Pneumokokken mit Ciprofloxacinresistenz. Die Abkürzungen bedeuten: CIP: Ciprofloxacin; CIP+RES: Ciprofloxacin-MHK in Anwesenheit von Reserpin; TRO: Trovafloxacin; GAT: Gatifloxacin; MOX: Moxifloxacin; SIT: Sitafloxacin; GEM: Gemifloxacin; *gyrA*: Untereinheit A der Gyrase; *gyrB:* Untereinheit der Gyrase B; *parC:* Untereinheit A der Topoisomerase IV; *parE*: Untereinheit B der Topoisomerase IV.

Eine grafische Darstellung der Mutationen im Gen ist in Abbildung 16 gegeben.

a) Mutationen im Gen *gyrA* (Gyrase Untereinheit A)

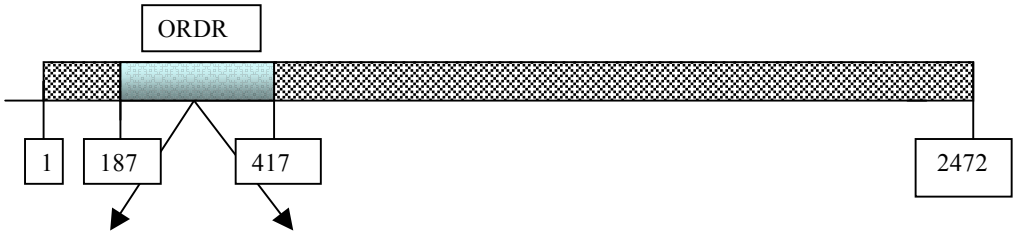


245C→T/A
Ser→Phe/Tyr
Codon 81

QRDR:
129
c cgt cgg att ctc tat gga atg aat gaa ttg ggt gtt act cca gac aaa ccc cat aaa aaa tct gct cgt att aca
R R I L Y G M N E L G V T P D K P H K K S A R I T
ggg gac gtc atg ggt aaa tac cac cca cac ggg gat tac tct atc tat gaa gcc atg gtc cgc atg gct caa
G D V M G K Y H P H G D Y S I Y E A M V R M A Q
tgg tgg agc tac cgt tac atg ctt gta gat ggg cat gga aac ttt ggt tcc atg gat gga gat ggt gct gcc gcc
W W S Y R Y M L V D G H G N F G S M D G D G A A A
caa cgt tat act gag gca cgt atg agc aag att gct ttg gaa atg ctt cgt gat atc aat aag aat acg gtt gat
Q R Y T E A R M S K I A L E M L R D I N K N T V D
ttc gtt gat aac tat gat gcc aat gaa cgg gaa ccc ttg gtc ttg cca gct cgt ttt cca aac ctt ttg gtc aat gga
F V D N Y D A N E R E P L V L P A R F P N L L V N G
gca act
A T
510

Primer
Mutationsorte
Beginn/Ende QRDR

b) Mutationen im Gen *parC* (Untereinheit A der Topoisomerase IV)

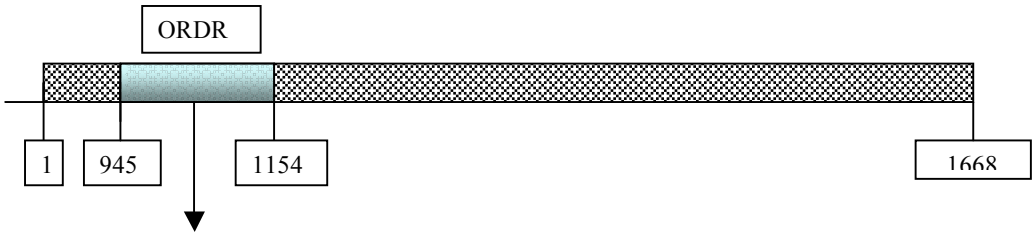


236C→T
Ser→Phe
Codon 79

247G→A
Asp→Asn
83

QRDR:
148
aag gat agc aat act ttt gac aag agc tac cgt aag tcg gcc aag tca gtc ggg aac atc atg ggg aat ttc cac
K D S N T F D K S Y R K S A K S V G N I M G N F H
cca cac ggg gat tct tct atc tat gat gcc atg gtt cgt atg tca cag gac tgg aaa aac cgt gag att ttg gtc
P H G D S S I Y D A M V R M S Q D W K N R E I L V
gaa atg cac ggt aac aac ggc tca atg gac gga gat cca cct gcg gct atg cgt tat act gag gcg cgt ttg tct
E M H G N N G S M D G D P P A A M R Y T E A R L S
gag att gct ggc tac ctt ctt caa gac atc gag aaa aag acc gtt cct ttt gct tgg aac ttt gac gat acc gag
E I A G Y L L Q D I E K K T V P F A W N F D D T E
aaa gaa cca ac
K E P
468

c) Mutationen im Gen *parE* (Untereinheit B der Topoisomerase IV)



1102A→G
Ile→Val
Codon 460

QRDR:
904
aag gcg cgt gat gag agc cga aat ggg aag aaa aac aag aaa gat aag ggc ttg ttg tct ggg aaa ttg acc
K A R D E S R N G K K N K K D K G L L S G K L T
cca gcc caa tct aag aat cct gct aag aat gaa ctc tat cta gtt gag ggg gac tct gcc ggt ggt tct gcc aaa
P A Q S K N P A K N E L Y L V E G D S A G G S A K
caa ggt cgt gac cgc aag ttc cag gct att cta cct ctt cgt ggt aag gtt atc aat aca gcc aag gcc aag atg
Q G R D R K F Q A I L P L R G K V I N T A K A K M
gcg gat atc ctc aaa aat gaa gag atc aat acc atg att tat acc att ggt gcg ggt gtt gga gca ga
A D I L K N E E I N T M I Y T I G A G V G A
1193

Abbildung 16: Lage der Qinolone Resistance Determining Region im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *parC* und *parE*.

Insgesamt 10 der 16 Stämme, deren MHK-Wert ≥ 4 mg/l für Levofloxacin betrug, besaßen die Mutation in *parC Ser79Phe* und 6 die Mutation *Asp83Asn*, wobei alle 16 Isolate in *gyrA* entweder die Mutation *Ser81Phe* oder *Ser81Tyr* aufwiesen. Keine dieser Mutationen wurden hingegen in den 9 Isolaten gefunden, deren MHK < 4 mg/l für Levofloxacin, aber ≥ 4 mg/l für Ciprofloxacin betrug.

Eine Mutation in *parE*, nämlich *Ile460Val*, konnte in 18 der 25 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten nachgewiesen werden. In *gyrB* hingegen wurden keine Mutationen gefunden.

Ungeachtet der vorkommenden Mutationen stellten sich bei allen Isolaten die Substanzen Gemifloxacin, Sitafloxacin und Clinafloxacin als am wirksamsten dar, während Ciprofloxacin die geringste Aktivität aufwies. Insbesondere Gemifloxacin uns Sitafloxacin zeigten niedrige MHK-Werte, der höchste lag mit 0,5 mg /l noch unter dem Grenzwert für Resistenz (1 mg/l).

Desweiteren führten wir mit den 25 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten Resistenztestungen mittels Agardiffusionstest für Penicillin und Erythromycin durch. Dabei stellte sich heraus, dass eine verminderte Ciprofloxacin-Sensibilität häufig mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Penicillin und Erythromycin vergesellschaftet war. 8 der 25 Stämme erwiesen sich als hochresistent gegenüber Penicillin und weitere 5 als intermediär resistent. Bezogen auf Erythromycin zeigten 11 Isolate eine hohe Resistenz und 1 Isolat war intermediär resistent.

Es konnte also ein weiteres Mal gezeigt werden, dass Resistenzen gegenüber Chinolonen häufig als Multiresistenzen, also in Kombination mit Penicillin-Resistenzen auftreten. Außerdem zu beachten ist der deutlich geringere Einfluss von Resistenzmutationen auf neuere Fluorchinolone.

<u>Efflux</u>

Es ist anzunehmen, dass in den meisten Fällen ein Effluxpumpensystem entscheidend zur Resistenzentwicklung beigetragen hat, da bei Zugabe von Reserpin die MHK-Werte gegenüber Ciprofloxacin in 12 der 25 *S. pneumoniae*-Stämmen um 2 – 4 Stufen gesenkt wurden. Der Auswärtstransport der hydrophilen Chinolone trug also in den meisten Fällen zur Resistenzerhöhung der getesteten Isolate bei. Die MHK-Werte in An- und Abwesenheit von Reserpin sind Tabelle 7 zu entnehmen.

4.2.3 Enterobacteriaceae (E. aerogenes, E. cloacae, K. pneumoniae und K. oxytoca)

Von den gesammelten 501 *Enterobacter-spp*.-, 465 *K. pneumoniae*- und 148 *K. oxytoca*-Isolaten wurde ein Großteil (24 *E. aerogenes*, 22 *E. cloacae*, 22 *K. pneumoniae* und 4 *K. oxytoca*) der epidemiologisch nicht verwandten Ciprofloxacin-resistenten Isolate sowie einige randomisiert ausgewählte Ciprofloxacin-sensible Isolate untersucht. Desweiteren erfolgte die Bestimmung der MHK-

Werte von 6 Fluorchinolonen, nämlich Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin und Trovafloxacin) gegenüber diesen Isolaten mit Antibiotika-Konzentrationen von 0,06 – 16 µg/ml.

Die Sequenzen ohne Mutationen wurden als identisch mit den veröffentlichten Sequenzen der *gyrA*- und *parC*-Gene betrachtet und konnten so identifiziert werden (Deguchi *et al.*, 1995; Deguchi *et al.,* 1997; Dimri, 1990; Weigel *et al.*, 1998).

In Tabelle 7 sind die identifizierten Mutationen bei *Klebsiella* und *Enterobacter spp.* aufgelistet.

Spezies	*gyrA*	*parC*	Aminosäureaustausch
Enterobacter aerogenes	449C→G	440T→G	Ser83→Ile; Ser80→Ile
	449C→G	440T→C	Ser83→Ile; Ser80→Arg
	450G→T	440T→G	Ser83→Thr; Ser80→Ile
	416A→C; 449C→G	440T→G	Asp72→Glu; Ser83→Ile;Ser80→Ile
	401A→T; 434T→A; 449C→G; 461C→A	440T→G	Ala67→Ser; Ile78→Val; Ser83→Ile; Asp87→Asn; Ser80→Ile
Enterobacter cloacae	450A→G	440T→G	Ser83→Phe; Ser80→Ile
	448T→A; 460C→G	440T→G	Ser83→Tyr; Asp87→Asn; Ser80→Ile
	450A→G; 460C→A	440T→G	Ser83→Phe; Asp87→Gly; Ser80→Ile
	448T→A; 460C→A	440T→G	Ser83→Tyr; Asp87→Gly; Ser80→Ile
	448T→A; 460C→T	440T→G	Ser83→Tyr; Asp87→His; Ser80→Ile
Klebsiella pneumoniae	249T→C	-	Ser83→Tyr
	249T→G	-	Ser83→Phe
	249T→G; 261A→G	-	Ser83→Phe; Asp87→Tyr
	250T→A	-	-
	249T→A	240C→G	Ser83→Ile; Ser80→Ile
	249T→G	240C→G	Ser83→Phe; Ser80→Ile
	249T→G; 260G→C	240C→G	Ser83→Phe; Asp87→Asn; Ser80→Ile
	249T→C; 261A→G	240C→G	Ser83→Tyr; Asp87→Tyr; Ser80→Ile
	249T→G; 260G→C	254A→T	Ser83→Phe; Asp87→Asn; Glu84→Lys
Klebsiella oxytoca	249G→C	-	Thr83→Ile
	249G→C	260G→T	Thr83→Ile; Ser80→Arg
	249G→C; 259T→G	240C→G	Thr83→Ile; Asp87→Gly; Ser80→Ile

Tabelle 7: Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC* bei vier verschiedenen Spezies und daraus resultierende Aminosäureaustausche.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wiesen die *gyrA*- und *parC*-Proteine von *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* jeweils drei bzw. acht einzelne oder kombinierte Aminosäurenaustausche in 4 bzw. 22 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten auf. Für *Enterobacter aerogenes* konnten fünf einzelne oder kombinierte Mutationen in 25 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten detektiert werden. Ebenfalls fünf verschiedene einzelne oder kombinierte Aminosäurenaustausche wurden bei *Enterobacter cloacae* in 22 Isolaten gefunden, die resistent gegenüber Ciprofloxacin waren.

Bei einem Großteil der Ciprofloxacin-resistenten *K. pneumoniae*-Stämme konnte in *gyrA* der schon bekannte Aminosäureaustausch *Ser83Tyr* oder *Phe* nachgewiesen werden (Deguchi *et al.,* 1997; Weigel *et al.*, 1998), desweiteren zeigte ein Isolat dieser Spezies folgende Veränderung: *Ser83 Ile*. Sechs resistente *K. pneumoniae*-Isolate wiesen einen Austausch von *Asp87 zu Asn* oder *Tyr* auf.

Bei fast allen *K. oxytoca*-Isolate trat in *gyrA* folgender Aminosäureaustausch auf: *Thr83 Ile*. Die Ausnahme stellte ein Isolat dar, welches eine neu beschriebene Veränderung von *Asp87* zu *Gly* zeigte.

Die resistenten *E. cloacae*-Isolate wiesen in *gyrA* hauptsächlich eine Veränderung von *Ser83* zu *Phe* oder *Tyr* auf (Deguchi *et al.*, 1997; Weigel *et al.*, 1998), wobei in 21 Isolaten folgende Aminosäurenaustausche gefunden werden konnte: *Asp87Asn*, *Asp87Gly* oder *Asp87His* (Deguchi *et al.,* 1997).

Für *E. aerogenes* konnte generell ein Austausch von *Ser83* zu *Ile* oder *Tyr* detektiert werden (Weigel *et al.*, 1998), bei einem Stamm war jedoch eine Veränderung von *Asp87* zu *Asn* zu beobachten. Wie aus Tabelle 8 zu entnehmen, konnten für *E. aerogenes* in *gyrA* weitere Aminosäureaustausche für *Ala67, Asp72* oder *Ile78* nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung von *parC* zeigten alle Ciprofloxacin-resistenten *Enterobacter*-Isolate einen Aminosäureaustausch von *Ser80* zu *Ile* oder *Arg*, wohingegen 12 von 22 *K. pneumoniae*-Isolaten und 2 von 4 *K. oxytoca*-Isolaten keine zusätzliche Veränderung in *parC* aufwiesen. Bei 8 *K. pneumoniae*-Stämmen fand allerdings in *parC* ein Austausch von *Ser80* zu *Ile* statt und bei weiteren 2 konnte folgende Veränderung detektiert werden: *Glu84Lys*. Bei *K. oxytoca* zeigten 2 Isolate einen Austausch von *Ser80* zu *Arg*.

In Tabelle 8 erfolgt eine Gegenüberstellung der einzelnen oder kombinierten Mutationen, die in *gyrA* oder *parC* auftraten, und der korrespondierenden MHK-Werte der getesteten Chinolone.

K. pneumoniae												
gyrA	*parC*	MHK ((µg/ml)										Antibiotikum
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	
Ser83→Tyr	-					4	3	2				Ciprofloxacin
					1	4	3	1				Levofloxacin
					3	4	1	1				Gatifloxacin
					2	4	2	1				Trovafloxacin
					1	5	2		1			Moxifloxacin
		1	4	3		1						Clinafloxacin
Ser83→Phe	-					2						Ciprofloxacin
						2						Levofloxacin
					1	1						Gatifloxacin
						2						Trovafloxacin
					1		1					Moxifloxacin
			1	1								Clinafloxacin
Ser83→Phe; Asp87→Tyr	-						1					Ciprofloxacin
							1					Levofloxacin
					1							Gatifloxacin
							1					Trovafloxacin
					1							Moxifloxacin
				1								Clinafloxacin
Ser83→Ile	-									1		Ciprofloxacin
									1			Levofloxacin
										1		Gatifloxacin
										1		Trovafloxacin
										1		Moxifloxacin
							1					Clinafloxacin
-	-					2	2					Ciprofloxacin
					1	3						Levofloxacin
					1	3						Gatifloxacin
					2	1	1					Trovafloxacin
					1	3						Moxifloxacin
			2	2								Clinafloxacin
Ser83→Phe; Asp87→Asn	Ser80→Ile								1	1		Ciprofloxacin
							1	1				Levofloxacin
								2				Gatifloxacin
							1	1				Trovafloxacin
								1	1			Moxifloxacin
					1	1						Clinafloxacin
Ser83→Tyr; Asp87→Tyr	Ser80→Ile									1		Ciprofloxacin
										1		Levofloxacin
										1		Gatifloxacin
										1		Trovafloxacin
										1		Moxifloxacin
							1					Clinafloxacin
Ser83→Phe; Asp87→Asn	Glu84→Lys									2		Ciprofloxacin
										2		Levofloxacin
										2		Gatifloxacin
										2		Trovafloxacin
										2		Moxifloxacin
								1	1			Clinafloxacin

K. oxytoca											
gyrA	*parC*	MHK ((µg/ml)									Antibiotikum
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	
Thr83→Ile	-					1		1				Ciprofloxacin
						2						Levofloxacin
						2						Gatifloxacin
						1		1				Trovafloxacin
							2					Moxifloxacin
			2									Clinafloxacin
Thr83→Ile	Ser80→Arg							1				Ciprofloxacin
							1					Levofloxacin
								1				Gatifloxacin
									1			Trovafloxacin
								1				Moxifloxacin
				1								Clinafloxacin
Thr83→Ile; Asp87→Gly	Ser80→Ile								1			Ciprofloxacin
								1				Levofloxacin
								1				Gatifloxacin
									1			Trovafloxacin
								1				Moxifloxacin
						1						Clinafloxacin

E.aerogenes											
gyrA	*parC*	MHK ((µg/ml)									Antibiotikum
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	
Ser83→Ile	Ser80→Ile							1	7	2		Ciprofloxacin
							1	6	3			Levofloxacin
								7	2	1		Gatifloxacin
									6	4		Trovafloxacin
									7	3		Moxifloxacin
				6	3		1					Clinafloxacin
Ser83→Ile	Ser80→Arg						1					Ciprofloxacin
							1					Levofloxacin
							1					Gatifloxacin
								1				Trovafloxacin
								1				Moxifloxacin
				1								Clinafloxacin
Ser83→Thr	Ser80→Ile									2		Ciprofloxacin
									1	1		Levofloxacin
								1	1			Gatifloxacin
										2		Trovafloxacin
									1	1		Moxifloxacin
						1	2					Clinafloxacin
Asp72→Glu; Ser83→Ile	Ser80→Ile								9	1		Ciprofloxacin
								3	7			Levofloxacin
							2	6	2			Gatifloxacin
									2	8		Trovafloxacin
								2	7	1		Moxifloxacin
				8	2							Clinafloxacin
Ala67→Ser; Ser83→Ile; Asp87→Asn; Ile78→Val	Ser80→Ile									1		Ciprofloxacin
										1		Levofloxacin
									1			Gatifloxacin
										1		Trovafloxacin
										1		Moxifloxacin
						1						Clinafloxacin

E. cloacae												
gyrA	*parC*	MHK ((µg/ml)										Antibiotikum
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	
Ser83→Phe	Ser80→Ile									1		Ciprofloxacin
										1		Levofloxacin
										1		Gatifloxacin
										1		Trovafloxacin
										1		Moxifloxacin
								1				Clinafloxacin
Ser83→Tyr; Asp87→Asn	Ser80→Ile								2	3		Ciprofloxacin
									2	3		Levofloxacin
								3	1	1		Gatifloxacin
									2	3		Trovafloxacin
									3	2		Moxifloxacin
						2	3					Clinafloxacin
Ser83→Phe; Asp87→Gly	Ser80→Ile								2	2		Ciprofloxacin
									2	2		Levofloxacin
								2	2			Gatifloxacin
									1	3		Trovafloxacin
									2	2		Moxifloxacin
						3	1					Clinafloxacin
Ser83→Tyr; Asp87→Gly	Ser80→Ile								5	4		Ciprofloxacin
								4	5			Levofloxacin
							1	6	2			Gatifloxacin
									3	6		Trovafloxacin
								1	7	2		Moxifloxacin
					1	6	2					Clinafloxacin
Ser83→Tyr; Asp87→His	Ser80→Ile							1	2			Ciprofloxacin
							1	2				Levofloxacin
							2	1				Gatifloxacin
								1	2			Trovafloxacin
								1	2			Moxifloxacin
					1	2						Clinafloxacin

Tabelle 8: Korrelation der minimalen Hemmkonzentratiom sechs verschiedener Chinolone mit Mutationen in den *gyrA*- und *parC*-Genen. Dargestellt ist die Anzahl der Isolate mit den entsprechenden MHK-Werten.

Die MHK-Werte von Ciprofloxacin gegenüber Isolaten ohne erkennbare Mutationen in *gyrA* oder *parC* lauteten: ≤0,06 µg/ml für *K. pneumoniae*, ≤0,06 – 0,25 µg/ml für *K. oxytoca*, ≤0,06 µg/ml für *E. cloacea* und 0,5-1,0 µg/ml für *E. aerogenes*.

Bei sämtlichen Isolaten, die Ciprofloxacin-empfindlich waren, konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit der verschiedene getesteten Chinolone festgestellt werden.

In *Klebsiella spp*. hatte die singuläre Veränderung bei *Ser83* in *gyrA* MHK-Werte von ≥ 2 µg/ml zur Folge, während ein zusätzlicher Aminosäureaustausch entweder bei *Asp87* in *gyrA* oder bei *Ser80* in *parC* einen weiteren Anstieg der MHK-Werte bedingte.

Im Gegensatz dazu führten in *Enterobacter spp*. kombinierte Mutationen in *gyrA* nicht zu einem Anstieg der MHK-Werte verglichen mit Einzelmutationen.

Ziel dieser Studie war es unter anderem, die in-vitro-Aktivität der neueren Fluorchinolone gegenüber *Klebsiella spp.*- und *Enterobacter-spp*.-Isolate mit bekannten Mutationen in *gyrA* und *parC* zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass die MHK-Werte von Clinafloxacin bei allen getesteten Ciprofloxacin-resistenten Stämmen mindestens ein bis zwei Verdünnungsstufen niedriger waren, als die der am wenigsten wirksamen Chinolone. Diese Beobachtung konnte für alle Kombinationen von Mutationen in *gyrA* und *parC* bestätigt werden.

16 von 22 *K. pneumoniae*-Isolaten erwiesen sich als resistent (MHK-Werte > 1 µg/ml) gegenüber Gatifloxacin, Trovafloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin, wohingegen 7 eine Resistenz gegenüber Clinafloxacin aufwiesen.

4 der *K. oxytoca*-Isolate waren resistent gegenüber sämtlichen getesteten Chinolonen außer Clinafloxacin, denn keines der Isolate dieser Spezies wies eine Resistenz gegenüber Clinafloxacin auf.

In *E. aerogenes* konnte in 6 Fällen eine Clinafloxacin-Resistenz festgestellt werden, 23 Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber den anderen Chinolonen.

20 Clinafloxacin-resistente Isolate sowie 22 Stämme, die eine Resistenz gegenüber den anderen Chinolonen aufwiesen, konnten bei *E. cloacae* gefunden werden.

4.3 BMS-294756

Im Gegensatz zu allen anderen Chinolonen, die sich derzeit auf dem Markt befinden, besitzt BMS-284756 kein Fluor-Atom am C-6-Atom des Chinolinrings. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es trotz dieser strukturellen Besonderheit eine gute Wirksamkeit gegenüber gegenüber vielen grampositiven als auch gramnegativen Bakterien besitzt (Fung-Tomc *et al.*, 2000). Weiterhin ist das breite antibakterielle Spektrum, welches auch Anaerobier umfasst (Hoellmann *et al.*, 2001), sowie die Wirksamkeit der Substanz gegenüber Chlamydien und Mykoplasmen erwähnenswert (Takahata *et al.*, 1999 und 2001).

Da die verschiedenen Chinolone sich sowohl in ihrer in-vitro-Aktivität als auch in ihren primären targets (entweder DNA-Gyrase oder Topoisomerase IV) unterscheiden (Drlica, 1997; Hooper, 1998; Hooper, 1995), könnte man vermuten, dass die phänotypische Ausprägung der Chinolonresistenz ebenfalls unterschiedlich sein wird. Studien haben gezeigt, dass in-vitro-Resistenzen gegenüber bestimmten Chinolonen in einigen Keimen vorkommen. Dies ist unbedingt zu berücksichtigen, vor allem zu Beginn der antimikrobiellen Therapie (Boos *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2001).

Durch die oben beschriebene strukturelle Veränderung in BMS-284756 soll ein günstigeres Nebenwirkungsprofil erreicht werden. Um die Wirksamkeit der Therapie nicht zu gefährden, ist es unabdingbar, Informationen über die in-vitro-Aktivität dieser neuen Substanz im Vergleich zu den älteren Präparaten, über den Einfluss klassischer Resistenzmutationen sowie über die Möglichkeit der Beteiligung von Effluxpumpen zu sammeln. Es wurde außerdem die Wirkung von BMS-284756 auf verschiedene problematische Resistenzphänotypen von Pneumokokken analysiert.

4.3.1 Unterschiede in der Resistenzentwicklung von S. aureus, S. pneumoniae und S. pyogenes gegenüber 6 verschiedenen Chinolonen und BMS-284756 im Überblick

Resistenzentwicklung

Um zunächst mögliche Unterschiede in der Resistenzentwicklung zwischen den Chinolonen zu detektieren, inkubierten wir jeweils 6 Stämme von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* über 10 Tage in subinhibitorischen Konznetrationen von Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Sparfloxacin, Moxifloxacin, Clinafloxacin, Gemifloxacin und BMS-284756. Die MHK-Werte der erhaltenen Mutanten wurden ermittelt und es erfolgte die Sequenzierung der QRDR der *gyrA*- und *parC*/*grlA*-Gene. Tabelle 9-11 zeigt die Ergebnisse der Resistenzentwicklung.

STAMM 1SA	**Antibiotikum**							**Alterationen der QRDR von**	
	Cipro	**Spar**	**Gati**	**Moxi**	**Clina**	**Gemi**	**BMS**		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,06	0,015	0,015	0,03	***gyrA***	***grlA***
Resistenzentwicklung in Stufen	7	8	6	3	7	13	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	32	8	4	2	0,5	2	0,25	-	Glu84→Lys
	64	16	4	4	1	0,5	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Tyr; Glu84→Lys
	64	16	4	8	0,5	4	1	Ser84→Leu	Ser80→Tyr; Glu84→Lys
	4	0,5	1	0,5	0,25	0,015	0,125	Ser84→Ala	Ser80→Phe
	128	8	16	2	2	4	n.b.	Ser84→Leu	Glu84→Lys
	2048	64	128	32	32	128	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Phe; Glu84→Lys
	32	n.b.	4	4	n.b.	n.b.	0,5	Ser84→Leu	Glu84→Lys

STAMM 2SA	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS	*gyrA*	*grlA*
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	0,03		
Resistenzentwicklung in Stufen	6	6	4	4	4	3	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	16	8	4	1	0,5	0,06	0,5	Ser84→Leu	Glu84→Lys
	4	4	2	1	0,25	0,5	n.b.	Ser84→Leu; Glu88→Lys	Ser80→Phe
	8	0,5	1	0,5	0,125	0,25	0,125	Ser84→Leu	Ser80→Phe
	4	4	1	1	0,25	0,5	0,25	Ser84→Leu	Glu84→Lys
	16	8	4	1	0,5	0,5	n.b.	Glu88→Lys	Glu84→Lys
	16	1	4	4	0,5	0,125	n.b.	Ser84→Leu	-
	8	n.b.	4	2	n.b.	n.b.	0,5	Ser84→Leu	Ser80→Tyr

STAMM 3SA	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS	*gyrA*	*grlA*
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	0,03		
Resistenzentwicklung in Stufen	5	6	4	3	4	9	3		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	8	0,125	0,5	0,125	0,125	0,125	0,06	-	Glu84→Lys
	4	4	2	1	0,125	0,5	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	8	4	1	1	0,25	0,5	0,5	Ser84→Leu	Ser80→Tyr; Glu84→Lys
	4	4	2	0,5	0,125	0,5	0,125	Ser84→Leu	Ser80→Phe
	16	8	4	2	0,5	2	n.b.	Ser84→Leu	Glu84→Lys
	128	8	8	4	0,5	8	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Phe
	8	n.b.	2	1	n.b.	n.b.	0,125	Ser84→Leu	Ser80→Phe

STAMM 4SA	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS	*gyrA*	*grlA*
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,125	0,06	0,06	0,06	0,03	0,03	0,015		
Resistenzentwicklung in Stufen	11	8	11	10	5	6	9		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	256	1	8	1	2	2	0,5	Ser84→Leu	Ser80→Phe; Glu84→Lys
	32	16	16	2	0,5	2	0,5	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	128	128	128	32	8	16	4	Ser84→Leu; Glu88→Lys	Ser80→Tyr
	64	128	128	64	16	16	4	Ser84→Leu	Ser80→Phe; Glu84→Lys
	128	64	4	1	1	1	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	16	1	1	8	0,25	1	n.b.	-	Ser80→Phe;
	128	n.b.	64	32	n.b.	n.b.	8	Ser84→Leu	Glu84→Lys

STAMM 5SA	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	0,015	***gyrA***	***grlA***
Resistenzentwicklung in Stufen	8	8	7	6	6	12	6		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	8	8	4	1	2	2	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	32	16	4	4	1	2	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	32	16	8	4	1	2	1	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	64	16	4	4	1	2	0,5	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	64	16	4	4	2	2	n.b.	Ser84→Leu	Glu84→Lys
	1024	32	32	16	8	64	n.b.	Ser84→Leu	Ser80→Tyr; Glu84→Gly
	64	n.b.	4	4	n.b.	n.b.	1	Ser84→Leu	Glu84→Lys
STAMM 6SA	**Antibiotikum**							**Alterationen der QRDR von**	
	Cipro	**Spar**	**Gati**	**Moxi**	**Clina**	**Gemi**	**BMS**		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	0,015	***gyrA***	***grlA***
Resistenzentwicklung in Stufen	8	2	4	0	0	5	3		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	8	8	2	1	4	1	Ser84→Leu	Ser80→Tyr
	0,5	0,25	0,125	0,125	0,03	0,06	n.b.	-	-
	4	0,5	1	0,25	0,125	0,06	0,06	-	Ser80→Phe
	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	0,015	-	-
	0,25	0,06	0,06	0,06	0,03	0,015	n.b.	-	-
	16	1	1	2	0,25	0,5	n.b.	-	Ser80→Phe
	4	n.b.	4	4	n.b.	n.b.	1	Ser84→Leu	Glu84→Lys

Tabelle 9: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei *6 S. aureus*-Stämmen
Stufen: MHK-Stufen, um die sich der MHK-Wert des Mutanten des 10. Tages gegenüber des MHK-Wertes des Ausgangsisolates erhöht hat.

STAMM 1SPN	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,125	0,125	0,06	0,03	0,015	0,015	**gyrA**	**parC**
Resistenzentwicklung in Stufen	8	7	8	10	5	9	8		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	8	8	2	0,5	0,5	1	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	32	16	8	2	0,25	0,5	n.b.	Ser81→Tyr	Ser79→Tyr
	32	32	32	16	8	1	2	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	64	32	64	64	8	8	8	Ser81→Phe	Ser79→Tyr; Asp83→Asn
	64	16	8	4	1	2	n.b.	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	32	32	128	32	8	8	n.b.	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	64	n.b.	64	32	n.b.	n.b.	4	Ser81→Phe	Ser79→Tyr

STAMM 2SPN	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,06	0,06	0,03	0,03	0,015	0,015	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	5	5	4	5	4	7	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	8	0,125	0,5	0,06	0,25	0,125	0,03	-	-
	4	2	1	0,5	0,125	0,125	n.b.	Ser81→Phe	-
	4	0,5	1	0,5	0,25	0,125	0,125	-	-
	16	4	4	1	0,5	0,25	0,25	Ser81→Phe	-
	4	2	1	0,5	0,5	0,125	n.b.	Ser81→Tyr	-
	32	8	64	2	2	2	n.b.	-	Asp78→Asn
	8	n.b.	2	1	n.b.	n.b.	0,25	-	Ser79→Tyr

STAMM 3SPN	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	1	0,125	0,25	0,125	0,125	0,015	0,03	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	6	6	5	5	3	6	6		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	8	8	2	1	0,5	1	Ser81→Phe	Ser79→Tyr; Asp83→Gly
	32	8	4	2	0,5	0,25	n.b.	Ser81→Phe	Asp83→Gly
	32	16	8	4	1	0,5	1	Ser81→Phe	Asp83→Gly
	64	32	16	4	2	2	1	-	Ser79→Tyr
	32	8	4	2	1	0,5	n.b.	Ser81→Phe	Asp83→Gly
	16	4	64	1	2	1	n.b.	Ser81→Phe	-
	32	n.b.	8	4	n.b.	n.b.	2	Ser81→Phe	Ser79→Tyr

STAMM 4SPN*	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	1	0,125	0,25	0,125	0,06	0,015	0,015	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	6	6	3	6	3	8	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	8	8	2	1	0,5	1	Ser81→Phe	Lys137→Asn; Ser79→Tyr; Asp83→Gly
	8	8	4	2	0,5	0,25	n.b.	Ser81→Phe	Lys137→Asn
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,5	-	Lys137→Asn
	64	32	16	8	1	1	2	Ser81→Phe	Lys137→Asn; Ser79→Tyr
	4	2	2	1	0,5	0,25	n.b.	Ser81→Phe	Lys137→Asn
	16	4	64	2	1	4	n.b.	Ser81→Phe	Lys137→Asn; Ser79→Tyr
	8	n.b.	2	1	n.b.	n.b.	0,25	Ser81→Phe	Ser79→Phe

STAMM 5SPN	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	1	0,125	0,25	0,125	0,06	0,015	0,015	**gyrA**	**parC**
Resistenzentwicklung in Stufen	1	7	4	4	3	6	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	2	0,25	0,5	0,25	0,125	0,06	0,125	-	-
	8	16	4	4	0,5	0,5	n.b.	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	16	32	4	4	0,5	0,5	1	Ser81→Tyr	Ser79→Phe
	8	8	4	2	0,25	0,25	0,5	Ser81→Phe	-
	32	16	8	4	0,5	0,5	n.b.	Ser81→Tyr	Ser79→Phe
	32	8	32	1	0,5	1	n.b.	-	Asp83→Tyr
	4	n.b.	2	1	n.b.	n.b.	0,25	Ser81→Phe	-
STAMM 6SPN	**Antibiotikum**							**Alterationen der QRDR von**	
	Cipro	**Spar**	**Gati**	**Moxi**	**Clina**	**Gemi**	**BMS**		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,25	0,03	0,06	0,03	0,03	0,015	0,015	**gyrA**	**parC**
Resistenzentwicklung in Stufen	8	5	10	7	4	4	3		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	64	4	4	2	0,5	0,5	0,25	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	2	1	0,5	0,5	0,125	0,06	n.b.	-	-
	8	8	64	16	4	2	1	Ser81→Phe	Ser79→Phe
	8	2	4	4	0,25	0,125	0,125	Ser81→Phe	Ser79→Ala
	2	1	1	0,5	0,5	0,03	n.b.	Ser81→Tyr	-
	8	1	32	1	0,125	0,25	n.b.	Ser81→Phe	-
	4	n.b.	1	0,5	n.b.	n.b.	0,125	-	Ser79→Tyr

Tabelle 10: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei 6 *S. pneumoniae*-Stämmen
Stufen: MHK-Stufen, um die sich der MHK-Wert des Mutanten des 10. Tages gegenüber des MHK-Wertes des Ausgangsisolates erhöht hat.

STAMM 1SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,5	0,25	0,25	0,125	0,03	0,03	0,03	**gyrA**	**parC**
Resistenzentwicklung in Stufen	2	5	3	3	3	3	4		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	2	1	1	0,5	0,125	0,06	0,25	-	-
	4	8	1	0,5	0,125	0,25	n.b.	Ser81→Tyr	Ser79→Ala
	2	4	2	1	0,25	0,125	0,25	Glu85→Lys	-
	2	4	1	1	0,25	0,125	0,25	Ser81→Phe	-
	1	1	0,5	0,5	0,25	0,06	n.b.	-	Asp78→Glu; Glu149→Lys*
	2	4	1	2	0,25	0,25	n.b.	-	-
	2	n.b.	1	1	n.b.	n.b.	0,5	-	-

STAMM 2SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (μg/ml)	0,125	0,06	0,06	0,06	0,03	0,06	0,004	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	7	9	6	8	4	3	8		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	16	16	4	2	0,5	0,25	1	Glu85→Lys	Ser79→Tyr
	16	32	16	8	2	2	n.b.	Ser82→Phe	Asp78→Asn
	16	16	4	4	0,5	0,5	1	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	16	32	32	16	4	4	2	Glu85→Lys	Ser79→Val
	8	8	4	2	0,5	0,125	n.b.	-	-
	8	4	2	2	0,25	0,5	n.b.	-	-
	16	n.b.	4	2	n.b.	n.b.	1	Ser81→Tyr	Ser79→Ala
STAMM 3SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (μg/ml)	2	0,5	0,25	0,25	0,06	0,06	0,06	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	2	4	4	6	6	5	5		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	8	4	2	2	0,5	0,125	0,25	-	Ser79→Ala
	8	8	4	2	0,5	0,5	n.b.	-	Ser79→Phe
	16	8	4	2	1	0,25	0,25	Ser81→Phe	Ser79→Ala
	32	64	16	16	2	2	2	Glu85→Lys	Ser79→Val
	32	64	32	16	2	1	n.b.	Ser81→Phe	Asp83→Tyr
	16	32	4	8	0,5	2	n.b.	-	Ser79→Ala
	32	n.b.	8	4	n.b.	n.b.	2	Glu85→Lys	Ser79→Ala
STAMM 4SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (μg/ml)	0,5	0,25	0,25	0,125	0,06	0,03	0,03	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	6	7	2	3	1	6	3		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	32	32	4	4	0,5	0,5	1	Ser81→Phe	Ser79→Tyr
	16	32	4	4	0,5	0,5	n.b.	Ser81→Tyr	Ser79→Ala; Asp83→Tyr
	2	2	1	1	0,25	0,25	0,25	-	-
	2	2	1	1	0,125	0,125	0,25	-	-
	2	1	0,5	0,5	0,125	0,06	n.b.	Ser81→Phe	-
	16	16	8	8	2	2	n.b.	-	Ser79→Tyr
	4	n.b.	1	1	n.b.	n.b.	0,25	-	Ser79→Phe

STAMM 5SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,5	0,25	0,25	0,125	0,03	0,03	0,03	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	2	4	2	4	2	3	3		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	2	2	1	1	0,25	0,06	0,06	-	Ser79→Phe
	4	4	4	1	0,25	0,25	n.b.	-	Ser79→Phe
	2	4	1	1	0,125	0,25	0,25	Ser81→Phe	-
	4	16	2	2	0,25	1	0,25	Glu85→Lys	Asp84→Asn
	1	1	0,5	0,25	0,125	0,125	n.b.	Ser81→Tyr	Glu58→Asp; Ser79→Ala*
	4	2	1	1	0,25	0,25	n.b.	-	Ser80→Phe
	2	n.b.	1	1	n.b.	n.b.	0,25	-	-
STAMM 6SPY	Antibiotikum							Alterationen der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	BMS		
Ausgangs-MHK-Werte (µg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,25	0,03	0,03	0,06	gyrA	parC
Resistenzentwicklung in Stufen	3	4	2	3	3	6	2		
MHK-Werte der selektierten Mutanten	4	1	1	0,5	0,25	0,06	0,125	-	-
	8	8	1	1	0,25	0,25	n.b.	-	Ser80→Phe
	4	2	2	1	0,25	0,25	n.b.	-	Asp78→Asn
	4	2	2	2	0,25	0,125	0,25	-	Asp84→Asn
	4	4	2	1	0,25	0,25	n.b.	-	Ser79→Val
	16	32	8	8	2	2	n.b.	Glu85→Lys	Ser79→Phe
	2	n.b.	1	1	n.b.	n.b.	0,25	-	-

Tabelle 11: Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Fluorchinolonen und BMS bei 6 *S. pyogenes*-Stämmen
Stufen: MHK-Stufen, um die sich der MHK-Wert des Mutanten des 10. Tages gegenüber des MHK-Wertes des Ausgangsisolates erhöht hat.

BMS wies die höchste Aktivität (0,004 – 0,03 mg/l) gegenüber allen Ausgangsisolaten auf, gefolgt von Gemifloxacin (0,015 – 0,06 mg/l), Clinafloxacin (0,015 – 0,125 mg/l), Moxifloxacin (0,03 – 0,25 mg/l), Sparfloxacin (0,03 – 0,5 mg/l), Gatifloxacin (0,06 – 0,5 mg/l) und Ciprofloxacin (0,125 – 2 mg/l). Eine Darstellung der Resistenzentwicklung eines Isolates jeder Spezies erfolgt in folgenden Abbildungen:

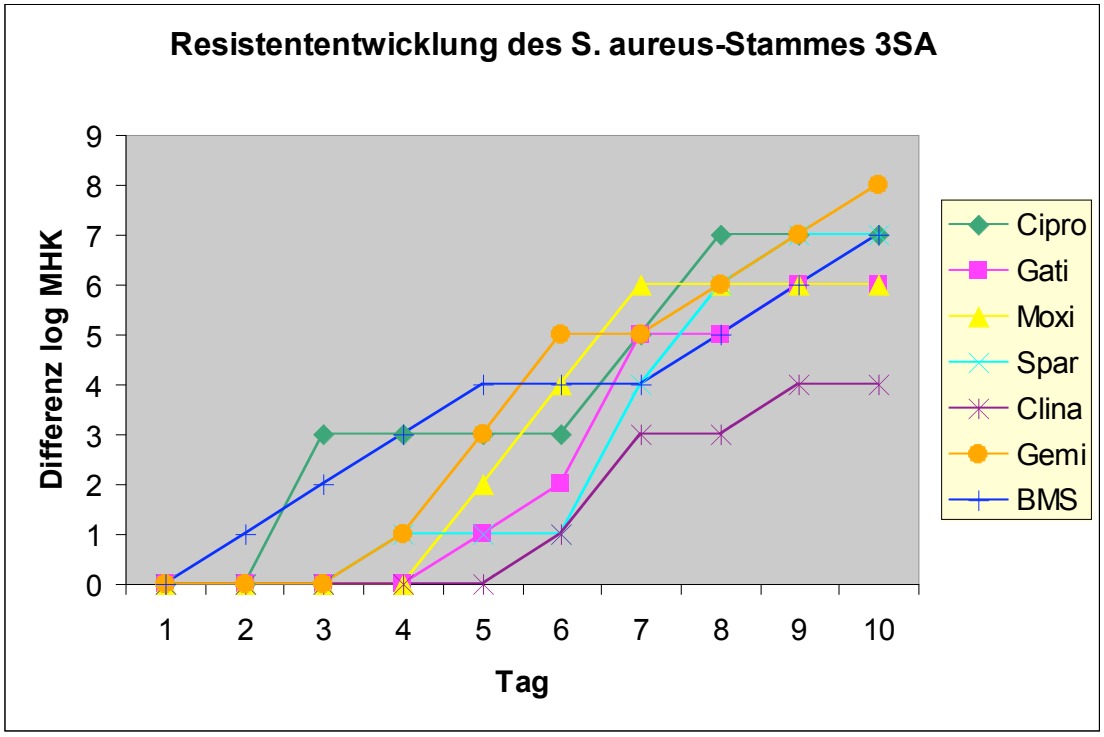


Abbildung 17: Resistenzentwicklung des *S. aureus*-Stammes 3SA. Dargestellt sind die Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangs-MHK-Werten bei 7 Substanzen über 10 Tage.

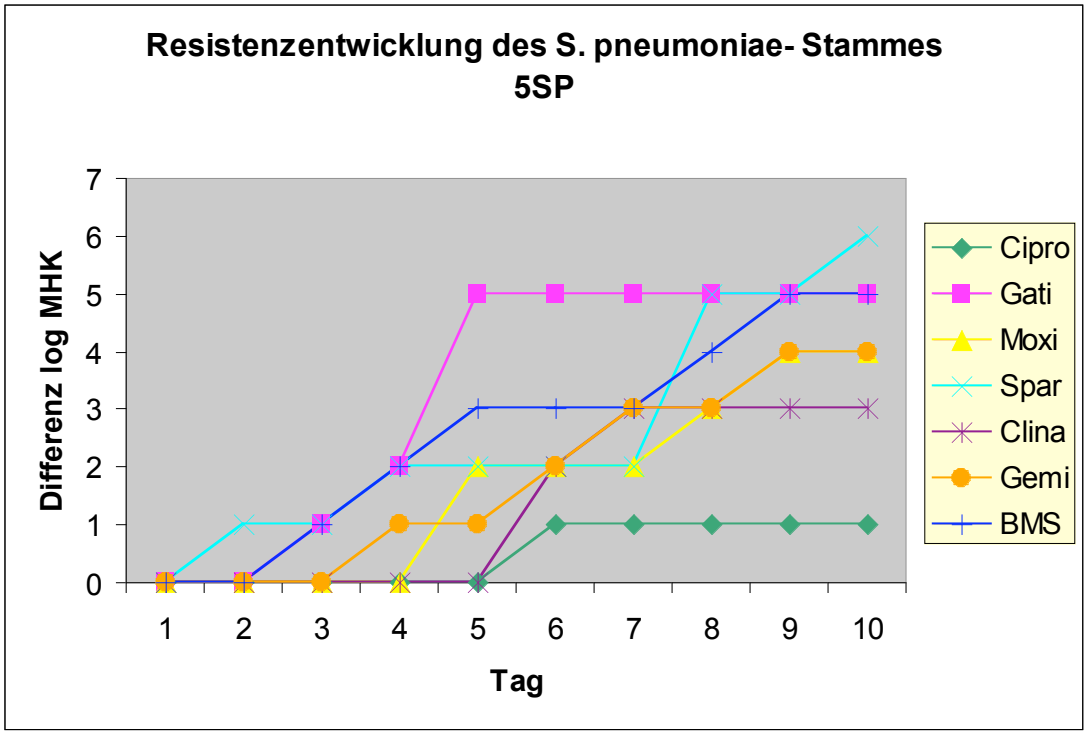


Abbildung 18: Resistenzentwicklung des *S. pneumoniae*-Stammes 5SP. Darstellung der Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangs-MHK-Werten bei 7 Substanzen über 10 Tage.

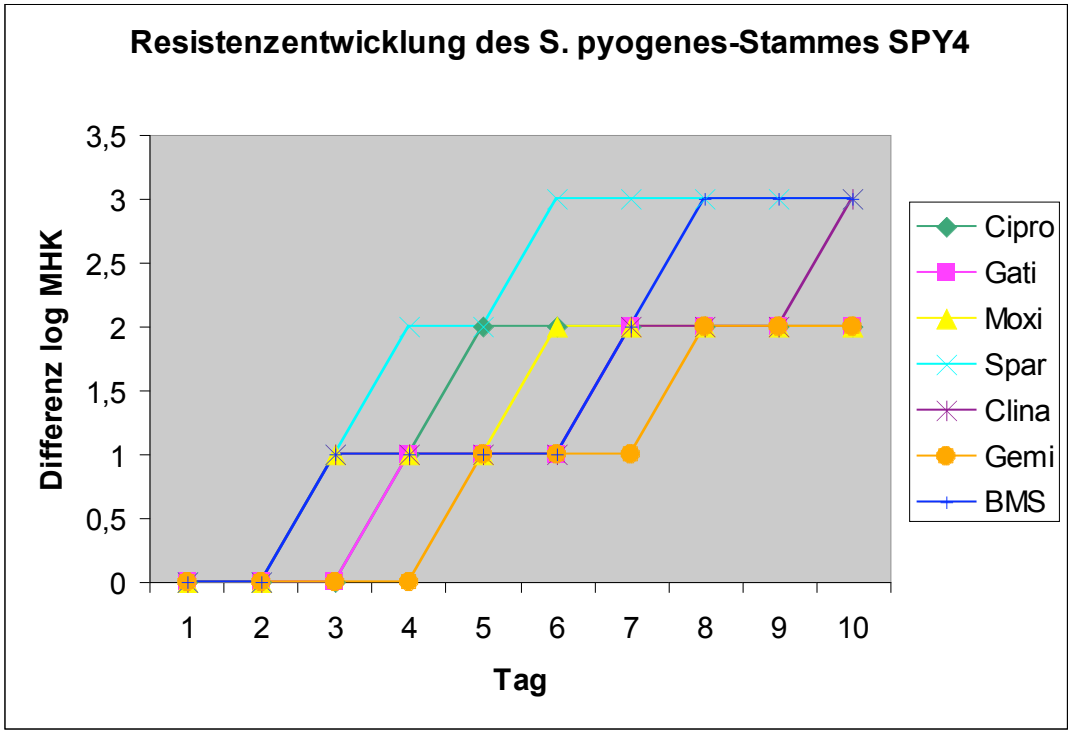


Abbildung 19: Resistenzentwicklung des *S. pyogenes* 4SPY. Darstellung der Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren individuellen Ausgangs-MHK-Werten bei 7 Substanzen über 10 Tage.

Die Entwicklung einer Resistenz durch Kultivierung trat unabhängig von der inititialen in-vitro-Aktivität der Chinolone auf und verlief stammspezifisch. Bei Betrachtung der Steigerung der MHK-Werte nach 10 Tagen zeigte keines der getesteten Chinolone eine deutlich geringere Tendenz zur Resistenzentwicklung. BMS-284756 scheint also ein ähnliches Potential zur Resistenzentwicklung aufzuweisen, wie die C-8 Methoxychinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin. Die mit BMS selektierten Mutanten von *S. pneumoniae* wiesen Veränderungen in *parC* (*Ser79Tyr* oder *Phe)* aund *gyrA* auf (*Ser80Phe*). Bei *Streptococcus pyogenes* wurden Alterationen in in *parC* (*Ser79Ala* oder *Phe*) und *gyrA* (*Ser81Tyr* oder *Glu85Gly*) gefunden. Außerdem trugen die klassischen Mutationen in *grlA* (*Ser80Tyr, Ser80Phe* oder *Glu84Lys*) und *gyrA* (*Ser84Leu*) in den selektierten *S. aureus*-Isolaten zur Resistenzentwicklung bei. Diese bekannten Mutationen sind bereits durch Selektion mit anderen Chinolonen aufgetreten (Jones *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*,1998; Yan *et al.*, 2000).

Um eine allgmeingültige Aussage treffen zu können, waren weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Isolaten nötig. Von besonderem Interesse war die Fragestellung, ob die Resistenzentwicklung für BMS stammspezifisch oder in Abhängigkeit von der chemischen Struktur des Antibiotikums verläuft.

Charakterisierung der selektierten Mutanten

Eine Darstellung der Ergebnisse der Sequenzierung zusammen mit den MHK-Werten ist in den Tabellen 9-11 gegeben. Nimmt man einen klinischen Grenzwert von ≤ 1 mg/l an, zeigten sich 88 der 108 selektierten Mutanten der 2 Spezies empfindlich gegenüber Clinafloxacin, 65 gegenüber Gemifloxacin, 59 gegenüber BMS, 46 gegenüber Moxifloxacin, 32 gegenüber Gatifloxacin, 20 gegenüber Sparfloxacin und 3 gegenüber Ciprofloxacin. Diese Reihenfolge konnte schon in früheren Untersuchungen festgelegt und hiermit nochmals bestätigt werden (Blondeau *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*,1999; Milatovic *et al.*,2000).

Bei jenen Mutanten, die mit Clinafloxacin oder auch Gemifloxacin selektiert wurden, konnten häufig auffällig hohe MHK-Werte gegenüber Ciprofloxacin, Sparfloxacin, Gatifloxacin und zum Teil auch Moxifloxacin nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die mit Clinafloxacin selektierte Mutante des *S. aureus* – Stammes 3SA, deren MHK-Wert für Clinafloxacin bei 0,5 mg/l lag, wohingegen die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Sparfloxacin zwischen 4 und 16 mg/l, d.h. über dem klinischen Grenzwert lagen.

Beim Vergleich der minimalen Hemmkonzentration für alle getesteten Fluorchinolone mit den jeweiligen Mutationen konnte gezeigt werden, dass identische Mutationen zweier Isolate nicht auch unbedingt identische MHK-Werte für die einzelnen Antibiotika nach sich ziehen. Als Beispiel können hier die signifikant unterschiedlichen MHK-Werte der mit Moxifloxacin selektierten Mutante des 2SA-Stammes sowie der mit Clinafloxacin selektierten Mutante des 1SA-Isolates herangezogen werden, obwohl sie identische Veränderungen in den QRDR von *gyrA* und *grlA* aufwiesen.

Efflux

Die Ausgangsisolate der ***Staphylokokken*** zeigten keine Überexpression der NorA Effluxpumpe. Bei den mit Ciprofloxacin oder Gemifloxacin selektierten Mutanten der *S. aureus*-Stämme konnte eine starke Beteiligung von Effluxpumpen an der Resistenz festgestellt werden. Wie in Tabelle 12 ersichtlich, wurden die MHK-Werte durch Zugabe von Reserpin um 2-4 Stufen reduziert. Zusätzlich konnte auch bei einigen der mit Clinafloxacin selektierten Mutanten bei Reserpinzugabe eine deutliche Verringerung des MHK-Wertes um 2-3 Stufen gezeigt werden.

Bei vier der sechs Ausgangsisolate der **Pneumokokken** war bereits eine signifikante Beteiligung der PmrA Effluxpumpe an der Resistenzentwicklung ersichtlich. Die MHK-Werte wurden bei Zugabe von Reserpin zusätzlich um 2-3 Stufen reduziert.

Keine effluxbedingte Resistenzerhöhung konnte bei ***S. pyogenes*** detektiert werden. Lediglich bei der mit Gemifloxacin selektierten Mutante des Stammes 6SPY konnte eine Absenkung des MHK-

Wertes um 3 Stufen bei Zugabe von Reserpin festgestellt werden. Eine Darstellung dieser Zusammenhänge ist in Tabelle 12 bis 14 gegeben.

Selektions-antibiotikum	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reserpin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reserpin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen
Stamm 1SA				**Stamm 4SA**		
Wildtyp	0,125	0,125	0	0,25	0,25	0
Cipro	4	32	3	16	256	4
Spar	32	64	1	32	32	0
Gati	64	64	0	64	128	1
Moxi	4	4	0	64	64	0
Clina	16	128	3	16	128	3
Gemi	128	2048	4	4	16	2
BMS	32	32	0	128	128	0
Stamm 2SA				**Stamm 5SA**		
Wildtyp	0,25	0,25	0	0,25	0,25	0
Cipro	1	16	4	16	64	2
Spar	2	4	1	16	32	1
Gati	8	8	0	16	32	1
Moxi	4	4	0	32	64	1
Clina	16	16	0	16	64	2
Gemi	2	16	3	128	1024	3
BMS	8	8	0	64	64	0
Stamm 3SA				**Stamm 6SA**		
Wildtyp	0,25	0,25	0	0,25	0,25	0
Cipro	1	8	3	4	64	4
Spar	2	4	1	0,5	0,25	1
Gati	4	8	1	2	4	1
Moxi	4	4	0	0,25	0,25	0
Clina	16	16	0	0,125	0,25	1
Gemi	16	128	3	1	16	4
BMS	8	8	0	4	4	0

Tabelle 12: Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der Wildtypen und der Mutanten des zehnten Tages der 6 *S. aureus*-Isolate bei Zugabe von Reserpin

Selektions-antibiotikum	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reser-pin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reser-pin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen
Stamm 1SP				**Stamm 4SP**		
Wildtyp	0,25	0,25	0	0,25	1	2
Cipro	64	64	0	16	64	2
Spar	32	32	0	1	8	3
Gati	32	64	1	0,5	8	4
Moxi	64	64	0	0,5	64	4
Clina	64	64	0	0,25	4	4
Gemi	32	32	0	1	16	4
BMS	64	64	0	8	8	0
Stamm 2SP				**Stamm 5SP**		
Wildtyp	0,06	0,25	2	0,125	1	3
Cipro	1	8	3	0,125	2	4
Spar	2	4	1	4	8	1
Gati	0,5	4	3	8	16	1
Moxi	8	16	1	2	8	2
Clina	0,5	4	3	16	32	1
Gemi	1	32	5	4	32	3
BMS	8	8	0	4	4	0
Stamm 3SP				**Stamm 6SP**		
Wildtyp	0,25	1	2	0,125	0,25	1
Cipro	32	64	1	32	64	1
Spar	16	32	1	1	2	1
Gati	32	32	0	4	8	1
Moxi	32	64	1	2	8	1
Clina	4	32	3	1	2	1
Gemi	1	16	4	1	8	3
BMS	32	16	1	4	2	1

Tabelle 13: Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der Wildtypen und der Mutanten des zehnten Tages der 6 *S. pneumoniae*-Isolate bei Zugabe von Reserpin

Selektions-antibiotikum	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reser-pin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen	MHK-Werte mit Reserpin	MHK-Werte ohne Reser-pin	Absenkung des MHK-Wertes in Stufen
Stamm 1SPY				**Stamm 4SPY**		
Wildtyp	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
Cipro	1	2	1	32	32	0
Spar	4	4	0	8	16	1
Gati	2	2	0	1	2	1
Moxi	2	2	0	1	2	1
Clina	0,5	1	1	1	2	1
Gemi	2	2	0	16	16	0
BMS	2	2	0	4	4	0
Stamm 2SPY				**Stamm 5SPY**		
Wildtyp	0,125	0,125		0,5	0,5	0
Cipro	8	16	1	2	2	0
Spar	8	16	1	4	4	0
Gati	16	16	0	2	2	0
Moxi	8	16	1	4	4	0
Clina	8	8	0	1	1	0
Gemi	4	8	0	4	4	0
BMS	16	8	1	2	2	0
Stamm 3SPY				**Stamm 6SPY**		
Wildtyp	2	2	0	0,5	0,5	0
Cipro	8	8	0	2	4	1
Spar	4	8	1	8	8	0
Gati	8	16	1	2	4	1
Moxi	32	32	0	2	4	1
Clina	32	32	0	2	4	1
Gemi	16	16	0	2	16	3
BMS	32	32	0	2	1	1

Tabelle14: Absenkung der Ciprofloxacin-MHK-Werte der Wildtypen und der Mutanten des zehnten Tages der 6 *S. pyogenes*-Isolate bei Zugabe von Reserpin

4.3.2 Vergleich der in vitro-Aktivität von BMS-284756 und anderen Chinolonen gegenüber S. aureus, S. pneumoniae und anderen Streptokokken-spp.

In der nächsten Versuchsreihe wurden die MHK-Werte für BMS und drei bzw. vier weitere Chinolone, nämlich Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und bei Pneumokokken auch Levofloxacin ermittelt. Es erfolgte also ein Vergleich der BMS-MHK-Werte mit dem gängigsten Fluorchinolon, dem Ciprofloxacin, sowie mit den beiden bereits vermarkteten C-8-methoxy-Fluorchinolonen Moxifloxacin und Gatifloxacin. Außerdem wurde bei einer großen Anzahl von Stämmen eine Sequenzierung der QRDR von *gyrA, parC/grlA* (Gyrase-Untereinheit A und Topoisomerase-IV-Untereinheit A) und, bei Staphylokokken, *grlB* (Topoisomerase-IV-Untereinheit B) durchgeführt. Auf Abbildung 20 erkennt man ein Agarosegel einer PCR der Quinolone-determining region.

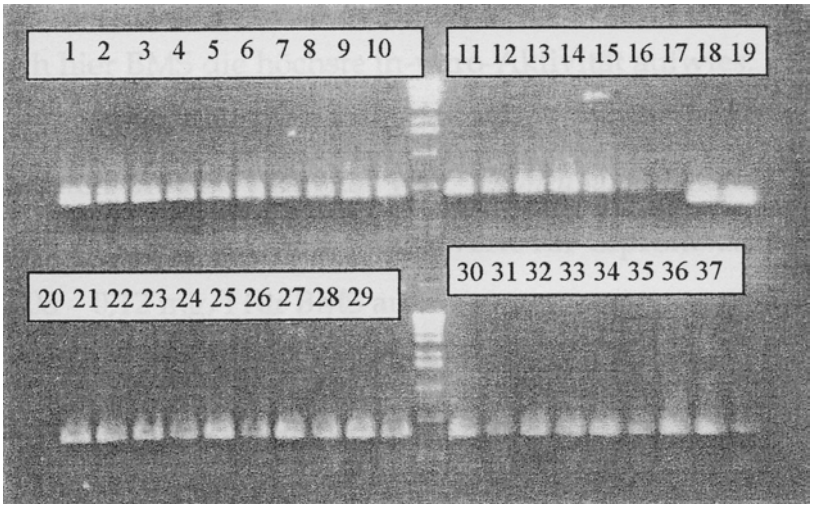


Abbildung 20: Zu erkennen sind die PCR-Fragmente der QRDR von *grlA* (1-17) und *grlB* (18-37). Mit 458 bp für *grlA* und 384 bp für grlB wiesen die PCR-Produkte die erwarteten Längen auf. Die PCR erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen.

4.3.2.1 Staphylococcus aureus

Die Bestimmung der in-vitro-Aktivität des neuen Chinolons BMS-284756 gegenüber verschiedenen ***S. aureus*** Stämme aus 8 verschiedenen Ländern mit definierten Mutationen in den *gr*l und *gyr* Genen stand im Vordergrund.

Ingesamt wurden 116 *S. aureus*-Isolate untersucht, darunter 93 MRSA (67 resistent gegen Ciprofloxacin und 26 empfindlich auf Ciprofloxacin) und 23 Methicillin-empfindliche *S. aureus* (MSSA) (3 Ciprofloxacin-resistent und 20 Ciprofloxacin-empfindlich). 70 der *S. aureus*-Isolate stammten aus Deutschland, die anderen 36 kamen aus Japan (8), Brasilien (8), der Schweiz (6), Sri Lanka (4), Spanien (4) , Großbritannien und Nordirland (3) und Ungarn (3). Sie wurden vor allem auf das Vorhandensein des *mecA*- und *coa*-Gens überprüft. Alle 116 Stämme stammen aus klinischen Quellen und wurden anhand der Zugehörigkeit zu verschiedenen PFGE-Typen (pulsed field gel electrophoresis) ausgewählt.

Entsprechend den beschriebenen Mutatione in den Genloki *grl, gyrA* und *norA* (Schmitz *et al.*,1998 ; Schmitz *et al.*, 1998) war die Reihenfolge der in-vitro-Aktivitäten wie folgt:

Ciprofloxacin erwies sich als am wenigsten wirksame Substanz, gefolgt von Ofloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin und letztlich Moxifloxacin.

Da Moxifloxacin in dieser Studie die wirksamste Substanz darstellte, erfolgte nun der Vergleich der in-vitro-Aktivität von BMS mit der von Moxifloxacin, dem C-8-Methoxychinolon Gatifloxacin und Ciprofloxacin.

BMS erwies sich als aktivste Substanz gegenüber *S. aureus*, gefolgt von Moxifloxacin und Gatifloxacin. Ciprofloxacin war das am wenigsten wirksame Präparat..

Es stellte sich bei ciprofloxacin-resistenten *S. aureus*-Stämmen heraus, dass die in-vitro-Aktivität von BMS zwei-bis viermal größer war als die von Moxifloxacin und vier- bis achtmal größer als die von Gatifloxacin. BMS inhibierte ciprofloxacin-resistente *S. aureus*-Isolate in Konzentrationen von 0,06-0,5 mg/l. Die Unterschiede in der in-vitro-Aktivität erwiesen sich bei den ciprofloxacin-sensiblen Stämmen als geringer. Abermals zeigte sich BMS als potenteste Substanz mit MHK-Werten zwischen ≤0,015 und 0,06 mg/l.

Solche Isolate, die nicht die Hauptveränderung in *grlA* aufwiesen (*Ser80Phe*), waren ciprofloxacin-sensibel und wiesen BMS-MHK-Werte von ≤0,06 mg/l auf, die MHK-Werte für Moxifloxacin lagen bei 0,12 mg/l und für Gatifloxacin bei 0,5 mg/l.

Bei allen ciprofloxacin-resistenten Isolaten konnte eine Veränderung in *grlA (Ser80Phe)* in Kombination mit einer Alteration in *gyrA*, nämlich entweder *Ser84Leu* oder *Glu88Lys* nachgewiesen werden. Der BMS-MHK-Wert betrug hier 0,06-0,5 mg/l, die MHK-Werte für Moxifloxacin und Gatifloxacin lagen bei 0,5-2 mg/l bzw. 1-8 mg/l. Insgesamt erwies sich also Ciprofloxacin als am wenigsten wirksame Substanz, gefolgt von Gatifloxacin und Moxifloxacin. Die aktivste Substanz bei allen gefundenen Mutationen und Mutationskombinationen war BMS.

Die verhältnismäßige Aktivität der 8-Methoxy-Chinolone gegenüber BMS bleibt jedoch gleich in Bezug auf die Hauptveränderungen in *gyrA* und *grlA*. Diesbezüglich scheint BMS von den gleichen Mutationen betroffen zu sein, die auch höhere MHK-Werte bei den C-8-Methoxychinolonen Moxifloxacin und Gatifloxacin herbeiführen. Im Gegensatz dazu ist Ciprofloxacin mehr von den Hauptveränderungen in den QRDR betroffen.

In Tabelle 15 sind die ermittelten Mutationen und MHK-Werte dargestellt.

Alterationen und entsprechende Amino-säureaustausche			Antibiotikum	Anzahl der Isolate mit MHK (mg/l)														
grlA	grlB	gyrA		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
-	-	-	Cipro				11	15	6	3	1							
			Gati		4	20	12											
			Moxi	2	4	28	2											
			BMS	2	22	12												
-	-	Ser112→Arg	Cipro					1										
			Gati				1											
			Moxi			1												
			BMS		1													
-	Glu422→Asp	Glu 88→Lys	Cipro							1								
			Gati					1										
			Moxi				1											
			BMS			1												
Ile45→Met	Glu422→Asp	-	Cipro						2									
			Gati				1	1										
			Moxi			1	1											
			BMS	1	1													
Pro144→Ser	-	-	Cipro					1										
			Gati				1											
			Moxi			1												
			BMS		1													
Pro144→Ser	Glu422→Asp	-	Cipro					1	2									
			Gati				2	1										
			Moxi			3												
			BMS		3													
Ser80→Phe	-	-	Cipro								1							
			Gati				1											
			Moxi			1												
			BMS			1												

Alterationen und entsprechende Amino-säureaustausche			Antibiotikum	Anzahl der Isolate mit MHK (mg/l)														
grlA	grlB	gyrA		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ser80→Phe	-	Ser84→Leu	Cipro										4	22	13	7	1	
			Gati							18	24	4	1					
			Moxi						14	32	1							
			BMS				4	30	13									
Ser80→Phe	-	Glu88→Lys	Cipro										1	9	2			
			Gati						1	4	4	3						
			Moxi						3	9								
			BMS				3	3	6									
Ser80→Phe Gly106→Asp	-	Ser84→Leu	Cipro											1				
			Gati								1							
			Moxi							1								
			BMS						1									
Ser80→Phe	Asp432→Gly	Ser84→Leu	Cipro											1				
			Gati								1							
			Moxi							1								
			BMS						1									
Ser80→Phe Glu84→Val	-	Glu88→Lys	Cipro													1	2	1
			Gati								3	1						
			Moxi							3	1							
			BMS					3	1									
Ser80→Phe Ala48→Thr	-	Ser84→Leu	Cipro													2		1
			Gati								2	1						
			Moxi							3								
			BMS					2	1									
Ser80→Phe Ala48→Thr	Pro451→Ser	Ser84→Leu	Cipro															1
			Gati								1							
			Moxi							1								
			BMS					1										

Alterationen und entsprechende Amino-säureaustausche			Antibiotikum	Anzahl der Isolate mit MHK (mg/l)														
grlA	**grlB**	**gyrA**		**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**
Ser80→Phe Ile45Met	Glu422→Asp	-	Cipro								1							
			Gati				1											
			Moxi			1												
			BMS		1													
Ser80→Phe Val41→Gly Ile45→Met	Glu422→Asp	Ser84→Leu	Cipro											1				
			Gati									1						
			Moxi								1							
			BMS						1									

Tabelle 15: *S. aureus*: Alterationen und resultierende Aminosäureaustausche in *gyrA, grlB* und *gyrA* und entsprechende MHK-Werte.

Desweiteren sollte die in-vitro-Aktivität von BMS gegen 7 **hetero-VISA-Stämme** (heterogeneous intermediate resistance to Vancomycin in *S. aureus*) untersucht werden, welche 1998 im Düsseldorfer Raum aufgetreten waren (Geisel *et al.*, 1998) und die Kriterien von Hiramatsu *et. al.* erfüllten (Hiramatsu *et al.,* 1997). Bei diesen sieben deutschen hetero-VISA-Isolaten betrugen die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS bei 128, 4, 2 und 0,5 mg/l. Auch in diesem Fall erwies sich BMS als die Substanz mit der höchsten in-vitro-Aktivität.

Zusätzlich bestimmten wir die MHK-Werte von BMS, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Ciprofloxacin für 125 **MRSA**. Diese MRSA-Stämme konnten mithilfe von PFGE drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Schmitz *et al.*, 1999), welche I, II und III genannt wurden (bestehend aus jeweils 75, 38 und 12 Isolaten) und die die hauptsächlich vorkommenden PFGE-Typen im westlichen Teil Deutschlands repräsentieren.
Über einen Zeitraum von 3 Jahren beobachteten wir konservierte Mutationen in den *grl, gyr* und *norA* Genloki und erfassten parallel dazu die MHK-Werte der MRSA-Isolate, welche sich einem bestimmten PFGE-Muster zuordnen ließen und welche von ganz verschiedenen klinischen Institutionen stammten (Schmitz *et al.,* 1999). Außerdem testeten wir, ob die MHK-Werte für BMS in diesen MRSA-Populationen stabil waren und fanden folgende Schwankungsbereiche : 1 – 4 mg/l für Gatifloxacin, 0,5 – 1 mg/l für Moxifloxacin und 0,125 – 0,25 mg/l für BMS.

Ein weiteres Ziel stellte die Überprüfung des Effekts von Reserpin auf die BMS-MHK-Werte gegenüber *S. aureus* dar.In vorangegangenen Studien konnte herausgefunden werden, dass die Effluxpumpenaktivität in *S. aureus*-Isolaten von dem Pflanzenalkaloid **Reserpin** hemmt wird (Schmitz *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1998). Das Vorhandensein von Reserpin, welches an sich das Wachstum der Bakterien nicht beeinflusst, führte bei keinem der getesteten Isolate zu einer Abnnahme der MHK-Werte für BMS. Es bestehen deutliche Schwankungen in der Empfindlichkeit von *S. aureus* gegen BMS. Dies wird besonders deutlich bei Betrachtung der bis zu 8-fachen Differenz der MHK-Werte, welche für die Isolate mit einer homologen QRDR erfasst wurden. Dieser Schwankungsbereich bleibt auch in Anwesenheit von Reserpin konstant. Folglich scheint BMS kein Substrat für die Effluxpumpenaktivität mittels NorA zu sein.

4.3.2.2 Streptococcus spp.

Ciprofloxacin, Levofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS-284756 wurden auf ihre Wirksamkeit gegen verschiedene klinische Isolate verschiedener Streptokokken-Spezies getestet, wobei unter diesen Isolaten auch solche mit reduzierter Chinolonempfindlichkeit waren. Zusätzlich zielte die Studie darauf ab, den Effekt von Reserpin, einem Hemmstoff der multi-drug-efflux-Pumpen, auf die MHK-Werte von BMS-284756 in allen Streptokokken-Isolaten zu untersuchen.

Die MHK-Bestimmung der 5 untersuchten Chinolone erfolgte für alle 860 Isolate durch eine Mikrotiterverdünnungsmethode mit Antibiotikakonzentrationen von 0,06 – 64µg/ml, definiert nach dem National Committee for Clinical Laboratory Standards (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 1998). Die MHK-Werte für BMS-284756 wurden jeweils in An- und Abwesenheit von Reserpin bestimmt. (Boos *et al.*, 2001). Reserpin hemmt u.a. die bekannte Multi-Drug-Efflux-Pump PmrA, ohne das Wachstum der Keime zu beeinflussen. (Beyer *et al.*, 2000; Gill *et al.*, 1999; Markham *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1998) Die MHK-Testungen mit Reserpin wurden je dreimal wiederholt.

Zur Analyse der Resitenzentwicklungs-Geschwindigkeit wurden *S. pneumoniae* Isolate über 6-10 Tage in Flüssigkulturen mit subinhibitorischen Konzentrationen von den verschiedenen Chinlonen und BMS-284756 inkubiert. (Boos *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2001). Die MHK-Werte der am letzten Tag selektierten Mutanten wurden mit und ohne Reserpinzugabe ermittelt und die QRDRs der Zielstrukturantigene *gyrA* und *parC* sequenziert.

4.3.2.2.1 S. pneumoniae

Diese Isolate waren im Rahmen von Surveillance-Studien in ganz Europa und Südafrika zwischen 1997 und 2000 gesammelt worden (Milatovic *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1999) und wurden hinsichtlich ihrer MHK-Werte gegenüber Ciprofloxacin, Levofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS-284756 untersucht.

Es stellte sich heraus, dass BMS generell die Substanz mit der höchsten in-vitro-Aktivität gegenüber *S. pneumoniae* war.

In Tabelle 16 ist die genaue Verteilung der MHK-Werte gegenüber den vier Antibiotika in Zusammenhang mit den jeweiligen Mutationen aufgelistet.

Aminosäureaustausche		Antibiotikum	Anzahl der Isolate mit MHK (mg/l)										
parC	*gyrA*		≤0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
-	-	Cipro			1	6	14	7	1				
		Gati	1	3	19	6							
		Moxi	2	17	8	2							
		BMS	18	11									
Arg95→Cys	-	Cipro				1		1					
		Gati				2							
		Moxi		2									
		BMS	1	1									
Lys137→Asn	-	Cipro				1	3	2					
		Gati			6								
		Moxi		6									
		BMS	3	3									
Ser79→Phe	-	Cipro						1	1				
		Gati				1	1						
		Moxi			2								
		BMS		2									
-	Ser81→Phe	Cipro								1	1		
		Gati						1	1				
		Moxi					1	1					
		BMS			1	1							
-	Ser81→Tyr	Cipro						1	1	1			
		Gati				1	1	1					
		Moxi		1	2								
		BMS		2	1								
Asp78→Asn	Ser81→Phe	Cipro							1				
		Gati						1					
		Moxi					1						
		BMS			1								
Ser79→Phe	Ser81→Phe	Cipro								4	6	3	3
		Gati						3	8	5			
		Moxi					5	9					
		BMS			3	9	4						
Ser79→Phe Lys137→Asn	Ser81→Phe	Cipro								2	2		
		Gati								2	2		
		Moxi						3	1				
		BMS				2	2						
Asp83→Asn Lys137→Asn	Ser81→Phe	Cipro							2				
		Gati						2					
		Moxi				1	1						
		BMS			2								
Asp78→Asn Arg95→Cys	Ser81→Phe	Cipro							1				
		Gati						1					
		Moxi					1						
		BMS				1							
Asp78→Asn Lys137→Asn	Ser81→Phe	Cipro									1		
		Gati							1				
		Moxi						1					
		BMS					1						

Tabelle16*: S. pneumoniae*: Alterationen und resultierende Aminosäureaustausche in *gyrA* und *parC* mit entsprechenden MHK-Werten

Für Isolate ohne Mutation in *gyrA* und *parC* (n=29) konnten MHK-Werte von 0,25-4mg/l für Ciprofloxacin und ≤0,06-0,12 mg/l für BMS ermittelt werden. Isolate mit einer einzelnen Veränderung in *parC* (n=10) wiesen MHK-Werte von 0,5-4 mg/l für Ciprofloxacin und Werte ≤0,12-0,5 mg/l für BMS auf. Bei 5 Stämmen mit einer Einzelmutation in *gyrA* betrugen die MHK-Werte für Ciprofloxacin 2-16 mg/l und für BMS ≤0,12-0,5 mg/l. Außerdem gab es 26 Stämme mit kombinierten Mutationen, wobei bei Isolaten mit einer *Ser81Phe*-Mutation in *gyrA* und einer *Ser79Phe*-Mutation in *parC* die höchsten MHK-Werte nachzuweisen waren, nämlich 8-64 mg/l für Ciprofloxacin und 0,25-1 mg/l für BMS.
Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass einige Mutationskombinationen die MHK-Werte aller Chinolone zwar anhoben, BMS blieb jedoch, mit dem höchsten MHK-Wert bei 1 mg/l, extrem aktiv. Folglich ist es wirksam gegenüber Pneumokokken, auch gegenüber solchen mit bereits erhöhten MHK-Werten gegenüber Ciprofloxacin.

Einteilung der Pneumokokken nach resistenzphänotypischen Gesichtspunkten

Bei der Untersuchung der 593 *S. pneumoniae*-Stämme, die Atemwegs-, Haut- oder Schleimhaut- und Blutinfektionen hervorgerufen hatten, war von besonderem Interesse, ob verschiedenen Resistenzphänotypen Unterschiede in den MHK-Werten bedingen würden.

Zur Vereinfachung wurden 6 resistenzphänotypische Gruppen gebildet:

I. Isolate, die sich als voll empfindlich gegenüber Penicillin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfmethoxacol (Cotrimoxazol), Ciprofloxacin und Levofloxacin erwiesen (n=100).

II. Isolate, die sich als resistent gegenüber Erythromycin und Clindamycin (*erm(B)*-Genotyp; n=157) zeigten.

III. Isolate, die resistent gegenüber Erythromycin, jedoch sensibel gegenüber Clindamycin (*mef(E)*-Genotyp; n=58) waren.

IV. Isolate mit Resistenzen gegenüber Tetracyclin (*tet(M)*-Genotyp, n=200).

V. Isolate mit Resistenzen gegenüber Trimethoprim/Sulfmethoxacol (Cotrimoxazol) (n=50). Dabei bestanden Alterationen in der Dihydrofolatreduktase (*Ile100Leu*) kombiniert mit Insertionen von ein oder zwei Aminosäuren in der Region von *Arg89* bis *Tyr69* der Dihydropteroatsynthetase.

VI. Isolate mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin (MHK ≥ 4mg/l, n=28). Diese 28 Isolate zeigten die üblichen Alterationen in der „Quinolone Resistance Determining Region“ (QRDR) von *parC* (20 Isolate wiesen einen *Ser79Phe* Aminosäureaustausch auf, 6 Isolate mit *Asp83Asn* und 2 Isolate mit *Asp7Asn*) und *gyrA* (24 Isolate mit *Ser81Phe* und 4 Isolate mit *Ser81Tyr*)(Broskey *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 2000; Pestova *et al.*, 1999).

Die in-vitro-Aktivität von BMS gegenüber den Pneumokokken-Gruppen I bis V, nämlich den Gruppen ohne Chinolon-Resistenz, erwies sich als gut mit MHK-Werten zwischen ≤0,015-0,125 mg/l. Nur in Gruppe VI konnte eine Erhöhung der MHK-Werte festgestellt werden, die Spannweite betrug hier 0,125-1 mg/l. In den Gruppen I-V lagen die MHK50- und die MHK90-Werte bei 0,06 mg/l bzw. 0,125 mg/l. Bezüglich der MHK50- und der MHK90-Werte bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen von Isolaten, die als Resistenzgene entweder *erm(B)*, *mef(E)* oder *tet(M)* enthielten, oder Penicillin-sensibel bzw. resistent waren gegenüber Trimethoprim/Sulfmethoxazol.
Bei den 28 Isolaten, die der Gruppe VI angehörten und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen, zeigte BMS-284756 wiederum die höchste Aktivität auf, gefolgt von Moxifloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin und zuletzt Ciprofloxacin. Im direkten Vergleich lagen die MHK-Werte für Ciprofloxacin, der Substanz mit der geringsten in-vitro-Aktivität , zwischen 4 und 64 mg/l und für BMS-284756 als aktivster Substanz zwischen 0,125 und 1 mg/l.
In keinem Fall wurden die MHK-Werte von BMS-284756 durch Reserpinzugabe gesenkt, obwohl in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass Reserpin die Effluxpumpemaktivität in Pneumokokken-Isolaten hemmt (Beyer *et al.,* 2000; Markham *et al.,*1999; Schmitz *et al.*, 1998). Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese Substanz im Gegensatz zu anderen Chinolonen wie z.B. Ciprofloxacin offenbar kein Substrat für Effuxpumpen vom Typ der „Multidrug-Transporter“ darstellt.

In Tabelle 17 sind die entsprechenden MHK-Werte in mg/l bei den unterschiedlichen Pneumokokkengruppen aufglistet und eine grafische Darstellung der MHK90-Werte verschiedener Chinolone bei den jeweiligen Resistenzgruppen von *S. pneumoniae* erfolgt in Abbildung 21.

Gruppe	Antibiotikum	MHK-Bereich	MHK50	MHK90
I	Cipro	0,03 - 2	1	2
	Gati	≤0,015 - 0,5	0,25	0,5
	Moxi	≤0,015 - 0,25	0,125	0,25
	BMS	≤0,015 - 0,125	0,06	0,125
II	Cipro	0,06 - 2	1	2
	Gati	≤0,015 - 0,5	0,25	0,5
	Moxi	≤0,015 - 0,25	0,25	0,25
	BMS	≤0,015 - 0,125	0,06	0,125
III	Cipro	0,03 - 2	1	2
	Gati	≤0,015 - 0,5	0,25	0,5
	Moxi	≤0,015 - 0,25	0,125	0,25
	BMS	≤0,015 - 0,125	0,06	0,125
IV	Cipro	0,03 - 2	1	2
	Gati	≤0,015 - 0,5	0,5	0,5
	Moxi	≤0,015 - 0,25	0,25	0,5
	BMS	≤0,015 - 0,125	0,06	0,125
V	Cipro	0,03 - 2	1	1
	Gati	≤0,015 - 0,5	0,25	0,5
	Moxi	≤0,015 - 0,25	0,25	0,25
	BMS	≤0,015 - 0,125	0,06	0,125
VI	Cipro	4 - 64	8	32
	Gati	1 - 8	2	4
	Moxi	0,25 - 4	1	2
	BMS	0,125 - 1	0,25	0,5

Tabelle 17: Aktivität gegen Pneumokokken mit verschiedenen Resistenzphänotypen für fünf Chinolone. Angegeben sind MHK-Bereiche, MHK50- und MHK90-Werte (in mg/l). MHK50: MHK-Wert, bei dem 50% aller Isolate inhibiert wurden. MHK90: MHK-Wert bei dem 90% aller Isolate inhibiert wurden.

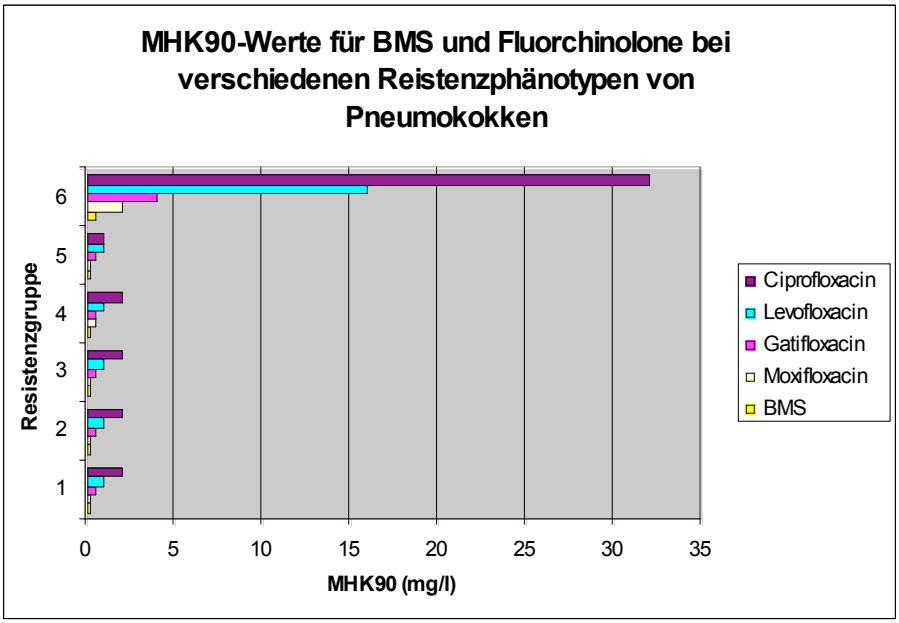


Abbildung 21: MHK90-Werte verschiedener Chinolone bei den jeweiligen Resistenzgruppen von *S. pneumoniae*. Beim Vergleich der MHK90-Werte fällt vor allem die größerer Aktivität von BMS gegenüber den anderen Chinolonen auf. Dieser Unterschied wird besonder deutlich in Gruppe VI, den Ciprofloxacin-resistenten Pneumokokken.

4.3.2.2.2 Andere Streptokokken-spp.

Insgesamt 267 Isolate anderer Streptokokken-Spezies (54 *Streptococcus mitis*, 31 *Streptococcus sanguis*, 12 *Streptococcus salivarius*, 40 *Streptococcus milleri* und 130 *Streptococcus pyogenes*-Isolate) wurden hinsichtlich ihrer in-vitro-Aktivität *gegenüber* BMS, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin untersucht (Milatovic *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2001).

Hierunter befanden sich 21 Stämme, 14 *S. mitis und* 9 *S. sanguis*-Isolate, die eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen (MHK-Wert: ≥ 4 mg/l). Sie wurden dementsprechend einer weiteren Untersuchung bezüglich der stattgefundenen Mutationen in den QRDRs (Schmitz *et al.*, 2001) unterzogen. Es zeigten sich die klassischen Aminosäureaustausche, die schon von *S. pneumoniae* bekannt sind: *Ser81Phe* oder *Tyr in gyrA* und *Ser79Phe* oder *Ile in parC* (Kaneko *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*,2001; Yan *et al.*, 2000). Diese Stämme zeigten außerdem die ausschlaggebenden Alterationen der Aminosäuren *Ser79Ile* oder *Phe* in *parC* und *Ser81Phe* oder *Tyr* in *gyrA*.

BMS-284756 wies auch gegenüber den übrigen Streptokokken-Spezies die höchste in-vitro-Aktivität im Vergleich mit den anderen Fluochinolonen auf. Bei den Ciprofloxacin-empfindlichen Isolaten zeigten sich MHK50-Werte zwischen 0,06 und 0,125 mg/l und MHK90-Werte zwischen 0,125 und 0,25 mg/l. Zwischen den verschiedenen Spezies konnten

keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. In Tabelle 18 erfolgt eine Darstellung der MHK-Bereiche, der MHK50- und der MHK90-Werte.

Die höchsten MHK-Werte für BMS wurden für ein *S. sanguis*-Isolat (0,125 mg/l) sowie für ein *S. mitis*-Isolat (0,25 mg/l) ermittelt. Diese Werte liegen jedoch auch deutlich unter dem vorläufigen Grenzwert für BMS-284756 von ≤ 1mg/l für empfindliche Isolate.
Die Zugabe von Reserpin führte auch im Falle dieser Streptokokken-Spezies nicht zu einer Veränderung des MHK-Wertes, folglich stellt BMS auch hier ein schlechtes Substrat für Multidrug-Effluxtransporter dar (Beyer *et al.*, 2000; Gill *et al.*,1999; Milatovic *et al.*, 2000).

Bakterien-Spezies (Anzahl der Isolate)	Antibiotikum	MHK-Bereich	MHK50	MHK90
Streptococcus viridans **(74)[a] -Ciprofloxacin empfindlich-**	Cipro	0,125-2	0,5	1
	Levo	0,125-1	0,25	0,5
	Gati	0,06-0,5	0,125	0,25
	Moxi	≤0,015-0,5	0,125	0,25
	BMS	≤0,015-0,125	0,06	0,125
Streptococcus viridans **(23)[b] -Ciprofloxacin resistent-**	Cipro	4-16	4	8
	Levo	1-4	1	2
	Gati	0,5-2	0,5	0,5
	Moxi	0,125-0,5	0,25	0,5
	BMS	0,06-0,25	0,125	0,125
Streptococcus milleri **(40)**	Cipro	0,25-1	0,5	1
	Levo	0,25-1	0,5	0,5
	Gati	0,06-0,5	0,25	0,25
	Moxi	≤0,015-0,25	0,125	0,25
	BMS	≤0,015-0,125	0,06	0,125
Streptococcus pyogenes **(130)**	Cipro	0,125-2	0,5	1
	Levo	0,125-2	0,5	1
	Gati	0,06-1	0,25	0,5
	Moxi	≤0,015-1	0,125	0,25
	BMS	≤0,015	0,125	0,25

[a] Beinhalten 40 *Streptococcus mitis,* 12 *Streptococcus salivarius* und 22 *Streptococcus sanguis*-Isolate.

[b] Beinhalten 14 *Streptococcus mitis* und 9 *Streptococcus sanguis*-Isolate.

Tabelle 18: MHK-Bereiche, MHK50- und MHK90-Werte von BMS und vier weiteren Chinolonen gegenüber verschiedenen Streptokokken-Spezies.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass BMS-294756 in allen Bereichen eine gute in-vitro-Aktivität aufweist, dies zeigt sich besonders im Vergleich mit älteren Fluorchinolonen wie beispielsweise Ciprofloxacin und bei problematischen Resistenzphänotypen. Die klassischen Resistenzmutationen haben einen deutlich geringeren Einfluss auf BMS als auf die älteren Fluorchinolone.

Da BMS auch kein Substrat für Effluxpumpen darzustellen scheint, kann seine Wirksamkeit als von den klassischen Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen weitgehend ungestört betrachtet werden.

4.3.3 Resistenzentwicklung einer großen Anzahl klinischer S. pneumoniae-Isolate gegenüber BMS-284756 und verschiedenen Chinolonen

Die Resultate der MHK-Bestimmung von verschiedenen Chinolonen gegenüber 6 *S. pneumoniae*-Stämmen (s. 4.3.1) bringen die Vermutung nahe, dass BMS-284756 eine ähnliche Tendenz zur Resistenzentwicklung aufweisen wird wie die C-8-Methoxy-Chinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin. Um eine statistisch signifikante Aussage zur Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit vor allem während der ersten Behandlungstage treffen zu können, führten wir weitere Versuche zur Resistenztestung mit C-8-Methoxy-Chinolonen im Vergleich zu Chinolonen mit einem anderen Substituenten an C-8 und des Des-Fluorchinolon BMS 284756 für 50 klinische Streptokokken-Isolate durch. Zu diesem Zweck wurden diese über 6 Tage in subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener Chinolone kultiviert. Es handelte sich um Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin und BMS-284756. Alle verwendeten Stämme waren empfindlich gegenüber Levofloxacin (MHK $\leq$ 2µg/ml) und waren von Patienten des Universitätsklinikums gesammelt worden, wobei nur ein Isolate pro Patient verwendet wurde. Es wurden sowohl die MHK-Werte der am letzten Tag isolierten Mutanten als auch die MHK-Werte der an den Tagen 1 – 6 isolierten Stämme und der Ausgangsisolate mit dem zur Selektion verwendeten Chinolon bestimmt. Es erfolgte die Bildung des Mittelwertes ± SEM (Standardabweichung) für alle 50 Stämme in den 5 Substanzgruppen.

Es zeigte sich ein durchschnittlicher Anstieg der MHK-Werte von 0,030 auf 0,142 mg/l für BMS, von 0,014 auf 0,250 mg/l für Gemifloxacin, von 0,122 auf 0,574 mg/l für Gatifloxacin, von 0,566 auf 4,724 mg/l für Levofloxacin sowie schließlich von 0,590 auf 15,562 mg/l für Ciprofloxacin.

Zur Analyse des Ausmaßes der Resistenzentwicklung erfolgte eine Konvertierung der MHK-Werte der Ausgangsisolate und der selektierten Mutanten in eine logarithmische Skala. Dabei wurden die Werte zum Zeitpunkt 0 (ursprüngliche MHK-Werte) von den folgenden MHK-Werten der Tage 1 – 6 subtrahiert. Die Steigung des MHK-Anstiegs über diese 6 Tage wurde mittels linearer Regression berechnet und verglichen, wobei eine ANOVA mit Student-Newman-Keuls post hoc Test verwendet wurde (Sachs, 1992). Die Vergleiche wurden hierbei als statistisch signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$ betrug. Entsprechend dem quadratischen Korrelationskoeffizienten R^2 (Mittlewert ± SEM: BMS: 0,766 ± 0,019; CIP: 0,922 ± 0,008; GAT 0,764 ± 0,019; GEM 0,931 ± 0,009; LEV 0,908 ± 0,009) war der lineare Zusammenhang der individuellen Steigungslinien gut, das heißt, dass die Regressionskoeffizienten ein vernünftiges Maß für die Resistenzentwicklungsrate darstellten. Die relativ niedrigen R^2 –

Werte von BMS und Gatifloxacin reflektierten eher ihre geringe Steigung, als ein Fehlen der Linearität.

Es erfolgte die Berechnung der mittleren MHK-Werte und 95%-Konfidenzintervalle (in Klammern) für die Ausgangsisolate bei angenommener log-Normalverteilung: GEM 0,017 µg/ml (0,014 / 0,019), BMS 0,030 µg/ml (0,027 / 0,035), GAT 0,175 µg/ml (1,141 / 0,219), CIP 0,707 µg/ml (0,618 / 0,809) und LEV 0,788 µg/ml (0,665 / 0,935). Eine Darstellung der Anstiege der MHK-Werte relativ zu ihren entsprechenden Ausgangs-MHK-Werten der 5 Chinolone über 6 Tage ist in der Abbildung 22 gegeben.

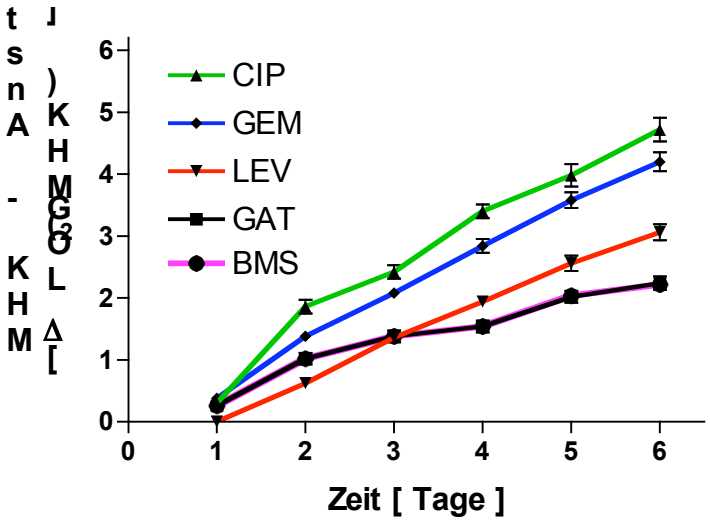


Abbildung 22: Anstiege der MHK-Werte relativ zu den individuellen Ausgangswerten während 6 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM für N = 50 Stämme. Die Daten für Gatifloxacin und BMS sind nahezu identisch.

Wie schon zuvor für verschiedene Antibiotikaklassen beschrieben, resultierte die Subkultivierung mit den verschiedenen Chinolonen in der Entwicklung von Resistenzen (Davies *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1993; Roychoudhry *et al.,*2001). Gemifloxacin wies die beste in-vitro Aktivität gegen sämtliche Ausgangsisolate und die selektierten Mutanten auf, gefolgt von BMS, Gatifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin. Diese schon bekannten Unterschiede bezüglich der in-vitro-Aktivitäten korrelieren allerdings nicht mit der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit. In Abbildung 23 ist der Anstieg der MHK-Werte für die 5 Chinolone (Mittelwert + SEM) dargestellt.

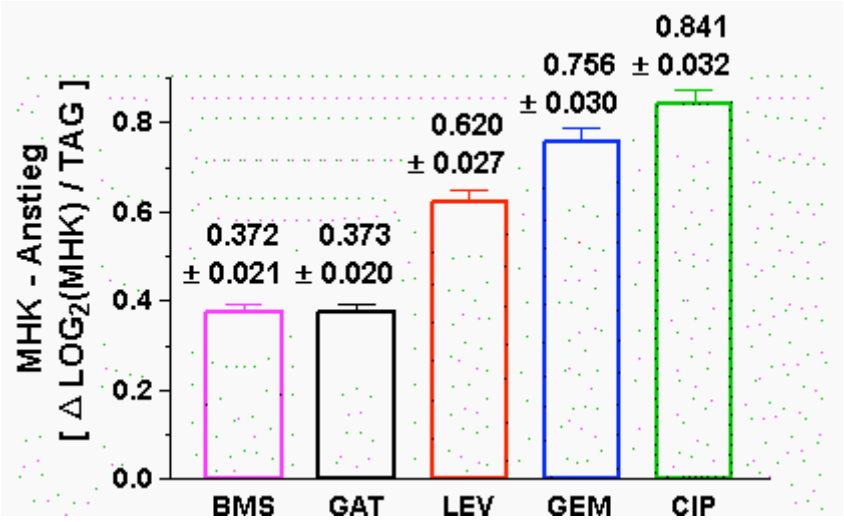


Abbildung 23: Dargestellt sind die Geschwindigkeiten der Resistenzentwicklung anhand der Steilheiten der individuellen zeitabhängigen MHK-Anstiege. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM. BMS und GAT zeigen die geringsten MHK Anstiege mit Raten, die im Mittel kleiner als 0,4-log2 Einheiten pro Tag betragen (entsprechend einem 1.30-fachen Anstieg pro Tag), während CIP die höchste mittlere Anstiegssteilheit mit größer 0,8-log2 Einheiten pro Tag aufweist (entsprechend einem 1.8-fachen Anstieg pro Tag).

Annähernd identische Steigungen konnten für Ciprofloxacin und Gemifloxacin gefunden werden. Beide Substanzen erreichten eher hohe log_2 -MHK-Anstiege nach 6 Tagen (CIP: 0,841 ± 0,031; GEM: 0,756 ± 0,030) während geringere Anstiege für LEV (0,620 ± 0,027), GAT (0,373 ± 0,020) und BMS (0,384 ± 0,018) ermittelt wurden. Die Resistenzentwicklungsraten sind in jedem Fall für die getesteten Stämme signifikant unterschiedlich.

Aus den oben aufgeführten Werten geht also hervor, dass BMS und Gatifloxacin die langsamste Resistenzentwicklung aufwiesen, gefolgt von Levofloxacin. Wie durch die Daten in Abbildung 20 erwartet, wurden die höchsten Steigungsraten von Ciprofloxacin und Gemifloxacin erreicht. Diese Unterschiede, die mittels der logarithmischen Skala gemessen werden konnten, korrelieren mit dem x – fachen Anstieg der initialen MHK-Werte pro Tag, nämlich 1,294-fach für BMS, 1,295-fach für Gatifloxacin, 1,537-fach für Levofloxacin, 1,689-fach für Gemifloxacin und letztendlich 1,791-fach für Ciprofloxacin. Es wird also sichtbar, dass BMS-284756 und Gatifloxacin die niedrigste Tendenz zur Resistenzentwicklung aufwiesen.
Die Länge der Zeitintervalle, in denen die MHK-Werte unter oder gleich dem klinischen Grenzwert von 1µg/ml (2 µg/ml für Levofloxacin), bezogen auf den Ausgangs-MHK-Wert, blieben, betrugen: BMS 14,1 ± 0,63 Tage, GAT 8,1 ± 0,3 Tage, LEV 3,1 ± 0,1 Tage, GEM 8,4 ± 0,4 Tage, CIP, 1,0 ± 0,1 Tage.
Bei Auswertung der Analyse von den QRDRs der selektierten *S. pneumoniae*-Mutanten ist zu erkennen, dass die Resistenzen der meisten Isolate hauptsächlich durch die klassischen Alterationen in *parC* (*Ser79Phe* oder *Tyr*; *Asp83Asn*) und *gyrA* (*Ser81Phe* oder *Tyr*) hervorgeru-

fen werden. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen (Fukuda *et al.*, 2001; Janoir *et al.*, 2001, Kaatz *et al.*,1993; Kaatz *et al.*,1995; Munoz-Bellido *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001; Philips *et al.*, 1987; Willmot *et al.*,1993). Desweiteren konnten keine Unterschiede zwischen den Mutationen der mit C-8-Methoxy-Chinolonen oder mit BMS selektierten Mutanten und solchen, die mit Chinolonen mit anderen funktionellen Gruppen an C-8 selektiert wurden, festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die C-8-Methoxy-Gruppe allein kein ausschließlicher Faktor für eine langsamere Resistenzentwicklung zu sein scheint (Schmitz *et al.*, 2001). Wahrscheinlich nehmen mehrere strukturelle Voraussetzungen der Substanzen, die eine geringere spontane Mutationsrate oder gesteigerte in-vitro-Aktivität nach sich ziehen, Einfluss auf die Resistenzentwicklungsrate.

Zusammenfassend zeigt BMS-284756 gegenüber allen getesteten Streptokokken-Spezies, insbesondere bezogen auf die Ciprofloxacin-resistenten Isolate, eine sehr gute Aktivität und weist gleichzeitig eine geringe Tendenz zu Resistenzentwicklung bei *S. pneumoniae* im Vergleich zu anderen Chinolonen auf.

4.3.4 Enterobacteriaceae

E sollte herausgefunden werden, ob BMS-284756, ein Chinolon ohne ein Fluoratom in C-6-Position, eine schnellere oder langsamere Resistenzentwicklung aufweisen würde verglichen mit herkömmlichen Chinolonen.

Um die Fähigkeit verschiedener Chinolone eine Resistenzentwicklung in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae und *Enterobacter cloacae* hervorzurufen zu testen, inkubierten wir mehrfach 50 Stämme jeder Spezies für 6 Tage mit Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin und BMS. Alle zu untersuchenden Stämme waren empfindlich gegenüber allen verwendeten Chinolonen und waren von klinischen Proben im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Düsseldorf kultiviert worden. Die MHK-Werte wurden mittels standardisierten Mikrodilutionsmethoden entsprechend den NCCLS-Labor-Richtlinien erfasst. (National Commitee 1998).

Um das Auftreten von mehrstufiger Chinolon-Resistenz zu charakterisieren, gaben wir ungefähr 5 x 10^7 CFU von jedem der 18 Stämme in Reagenzgläser, die mit 9,9 ml einer Luria Bertani-Brühe gefüllt waren. Diese Brühe enthielt antibiotische Konzentration von 3 zweifachen Verdünnungen über dem MHK bis zu 3 zweifachen Verdünnungen unter dem MHK von jeder der 6 Substanzen. Diese Mischung wurde dann für 24 Stunden bei 37ºC inkubiert. Reagenzgläser, die die höchste Antibiotikakonzentration enthielten und bei der noch ein sichtbares

Wachstum stattfand (i.e.0,5 x MIC) wurden daraufhin 1:1000 verdünnt und verwendet, um einen zweite Serie der Reihenverdünnungstests durchzuführen. Nach Inkubation über Nacht wurden die Bakterien ein weiteres Mal transferiert über einen Zeitraum von 6 Tagen. Nach Beendigung des Reihen-Transfers in den 4 verschiedenen Chinolon-enthaltenden Medien, sammelten wir die Bakterien mit dem höchsten MHK-Wert und konservierten sie für weitere Analysen. Diese Stämme wurden außerdem für 10 Tage auf Chinolon-freiem Agar subkultiviert, um die Stabilität der Chinolon-Resistenz, wie zuvor genau beschrieben (Boos *et al.* 2001) zu beurteilen.

Zusätzlich charakterisierten wir die Mutationen in den QRDRs von allen Chinolon-resistenten Mutanten, die innerhalb der 6 Tage im Chinolon enthaltenden Medium entstanden.Vorbereitete chromosomale DNA wurde als Vorlage verwendet zur Amplifikation der Ziel-QRDR mittels PCR. Die Primer und PCR-Bedingungen wurden bereits zuvor beschrieben (Schedletzky, 1999, Weigel 19998, Yoshida 1990). Die PCR-Produkte von *gyrA*, *gyrB*, *parE* und *parC* wurden mittels eines PCR purification kits (Quiagen Ratingen, FRG) aufgereinigt und mittels der dye terminator-Methode sequenziert. Die PCR-Produkte wurden dann aufgelöst und automatisch mit Hilfe des ABI PRISM 310 DNA sequencer analysiert.

4.3.4.1 Vergleich der in vitro-Aktivität von BMS-284756, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin gegenüber E.coli, K. pneumoniae und Enterobacter cloacae

Es erfolgte die Untersuchung von jeweils 50 *E. coli*-, K. pneumoniae- und E.cloacae-Isolaten über einen Zeitraum von 6 Tagen unter dem Einfluss von Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin and BMS. In Tabelle 19 sind die durchschnittlichen MHK-Werte (in µg/l) für die ursprünglichen Isolate aufgeführt und in Tabelle 20 erfolgt eine Darstellung der MHK-Bereiche des ersten und sechsten Tages.

Spezies	Durchschnittliche MHK-Werte (µg/ml) für die Antibiotika			
	BMS-284756	Moxifloxacin	Levofloxacin	Ciprofloxacin
E. coli	0,024	0,025	0,014	0,009
K. pneumoniae	0,12	0,126	0,054	0,029
E. cloacae	0,123	0,128	0,032	0,021

Tabelle 19: Durchschnittliche MHK-Werte der 50 verschiedenen *E. coli-, K. pneumoniae*- und *E. cloacae* Ausgangsisolate

E. coli								
Stamm	**Ausgangs-MHK-Werte**				**MHK-Werte des 6. Tages**			
	BMS	**Moxi**	**Levo**	**Cipro**	**BMS**	**Moxi**	**Levo**	**Cipro**
1	0,03	0,03	0,03	0,015	4	2	1	0,5
2	0,25	0,25	0,125	0,06	32	32	8	4
3	1	1	0,5	0,5	64	64	32	16
4	0,5	0,5	0,25	0,06	4	4	2	1
5	1	1	0,5	0,25	64	64	16	8
6	0,5	0,25	0,06	0,03	8	8	4	2
7	1	0,5	0,25	0,125	32	32	8	4
8	1	1	0,5	0,5	128	128	64	32
9	0,5	0,5	0,25	0,125	16	16	8	8
10	0,125	0,125	0,125	0,06	8	8	2	1
11	0,5	0,5	0,03	0,015	4	8	1	0,5
12	0,25	0,125	0,06	0,03	8	8	4	2
13	0,125	0,125	0,06	0,015	32	32	8	4
14	0,125	0,125	0,06	0,06	16	16	4	2
15	1	1	0,5	0,25	64	64	16	16
16	0,125	0,125	0,06	0,03	32	32	16	4
17	0,06	0,125	0,03	0,015	2	2	1	1
18	0,06	0,06	0,03	0,015	2	4	1	0,5
19	1	1	0,5	0,25	128	128	64	32
20	0,5	0,5	0,25	0,25	>128	>128	64	64
21	0,5	1	0,25	0,06	32	16	8	4
22	0,125	0,25	0,06	0,03	4	4	2	1
23	0,25	0,25	0,06	0,06	2	2	1	1
24	0,25	0,25	0,03	0,015	4	4	1	0,5
25	0,06	0,06	0,03	0,03	8	8	2	0,5
26	1	1	0,5	0,25	16	16	2	1
27	1	1	0,5	0,5	64	64	16	4
28	0,25	0,25	0,125	0,06	32	32	8	2
29	0,125	0,125	0,06	0,015	4	2	2	1
30	0,25	0,25	0,125	0,125	16	16	8	8
31	0,5	0,5	0,125	0,06	4	4	2	1
32	0,125	0,125	0,03	0,015	4	4	2	1
33	0,03	0,03	0,03	0,03	2	2	1	0,5
34	0,06	0,06	0,06	0,03	4	2	1	0,5
35	1	1	0,5	0,5	8	8	4	2
36	0,5	0,5	0,25	0,25	16	16	8	2
37	0,25	0,125	0,03	0,015	2	2	2	1
38	1	0,5	0,25	0,125	16	16	8	4
39	0,125	0,125	0,06	0,06	32	32	4	2
40	0,06	0,06	0,03	0,03	2	2	1	1
41	0,25	0.25	0,06	0,03	4	4	2	1
42	0,5	0,5	0,25	0,125	8	4	4	2
43	0,5	0,5	0,125	0,25	2	2	1	1
44	0,125	0,125	0,06	0,06	2	2	1	0,5
45	0,03	0,03	0,015	0,015	4	4	2	0,5
46	1	1	0,5	0,25	>128	32	32	8
47	0,125	0,25	0,06	0,03	4	2	2	0,5
48	0,125	0,125	0,03	0,015	4	4	1	0,5
49	0,25	0,25	0,125	0,06	8	8	4	2
50	1	1	0,5	0,25	32	16	8	4

Tabelle 20: MHK-Bereiche des ersten und sechsten Tages von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *E. coli.*

K. pneumoniae								
Stamm	Ausgangs-MHK-Werte				MHK-Werte des 6. Tages			
	BMS	Moxi	Levo	Cipro	BMS	Moxi	Levo	Cipro
1	0,125	0,125	0,06	0,03	8	4	2	1
2	2	1	0,5	0,5	>128	>128	128	64
3	1	0,5	0,125	0,06	16	16	4	2
4	2	2	0,25	0,25	32	32	4	4
5	2	2	0,25	0,125	64	32	8	4
6	0,125	0,125	0,06	0,03	32	32	4	2
7	0,25	0,25	0,06	0,03	16	16	2	2
8	0,5	0,5	0,125	0,06	16	16	2	2
9	1	0,5	0,25	0,125	32	64	16	8
10	0,125	0,25	0,06	0,06	64	64	16	8
11	1	1	0,125	0,06	>128	128	32	16
12	0,25	0,25	0,06	0,03	16	8	2	1
13	2	1	0,25	0,125	32	32	4	2
14	1	2	0,5	0,125	64	64	4	4
15	2	2	0,5	0,25	>128	128	8	4
16	0,125	0,125	0,06	0,06	64	32	16	2
17	0,5	0,5	0,125	0,06	>128	>128	32	2
18	1	0,5	0,06	0,03	16	16	4	1
19	0,5	1	0,25	0,125	8	8	2	2
20	1	1	0,06	0,03	16	16	4	4
21	2	2	0,5	0,25	>128	>128	32	16
22	2	2	0,5	0,5	>128	>128	32	32
23	0,5	0,25	0,125	0,06	2	2	1	1
24	0,25	0,25	0,125	0,03	2	2	1	1
25	0,5	0,5	0,125	0,125	32	32	4	2
26	0,5	0,5	0,25	0,125	8	8	4	4
27	0,125	0,125	0,06	0,03	8	4	2	1
28	0,5	1	0,25	0,06	8	4	2	2
29	2	2	0,5	0,25	32	16	8	4
30	0,5	0,5	0,25	0,125	16	16	4	2
31	1	1	0,5	0,5	>128	>128	16	8
32	2	2	0,125	0,06	4	4	2	2
33	0,125	0,125	0,06	0,03	4	4	1	1
34	0,5	1	0,125	0,125	32	32	16	4
35	1	1	0,25	0,25	>128	>128	32	8
36	0,5	0,5	0,25	0,125	64	64	8	2
37	0,25	0,125	0,06	0,03	2	2	1	1
38	0,25	0,25	0,06	0,03	8	4	2	1
39	0,25	0,25	0,125	0,03	4	4	2	1
40	0,5	0,5	0,25	0,06	16	8	4	1
41	1	1	0,25	0,06	16	16	8	2
42	2	2	0,5	0,25	32	16	8	4
43	1	1	0,25	0,125	>128	128	16	16
44	0,25	0,25	0,06	0,03	8	8	4	2
45	0,125	0,25	0,06	0,06	32	16	8	1
46	1	2	0,5	0,25	32	16	8	4
47	1	2	0,5	0,5	>128	>128	128	32
48	0,125	0,125	0,06	0,03	32	32	8	8
49	0,5	0,5	0,125	0,06	16	16	8	4
50	1	1	0,25	0,125	>128	128	32	16

Tabelle 21: MHK-Bereiche des ersten und sechsten Tages von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *K. pneumoniae*.

E. cloacae								
Stamm	Ausgangs-MHK-Werte				MHK-Werte des 6. Tages			
	BMS	Moxi	Levo	Cipro	BMS	Moxi	Levo	Cipro
1	0,25	0,125	0,06	0,03	4	4	2	1
2	1	1	0,5	0,5	16	8	4	2
3	2	2	0,25	0,25	16	16	4	2
4	2	1	0,5	0,25	32	32	4	4
5	0,5	0,5	0,25	0,125	32	32	4	4
6	0,25	0,25	0,06	0,03	8	8	4	2
7	0,125	0,125	0,06	0,03	16	16	8	2
8	0,125	0,25	0,06	0,03	8	8	4	1
9	0,25	0,25	0,125	0,06	4	4	2	2
10	0,5	0,5	0,125	0,06	16	8	8	2
11	0,25	0,25	0,06	0,06	8	16	4	2
12	2	2	0,25	0,125	32	32	16	8
13	1	1	0,25	0,25	64	64	32	16
14	1	2	0,5	0,5	128	128	64	32
15	1	0,5	0,06	0,03	2	2	1	1
16	0,5	0,5	0,06	0,06	2	2	1	1
17	1	1	0,5	0,25	8	8	4	4
18	2	2	0,25	0,125	32	32	16	8
19	2	1	0,25	0,25	64	64	32	16
20	1	2	0,06	0,06	8	8	2	1
21	0,25	0,25	0,125	0,03	4	4	2	1
22	1	1	0,5	0,5	32	32	16	8
23	0,5	0,5	0,125	0,06	64	32	16	4
24	0,25	0,125	0,06	0,03	16	32	8	2
25	0,125	0,25	0,06	0,03	16	16	8	2
26	0,5	0,5	0,125	0,125	128	128	64	16
27	1	2	0,5	0,25	>128	>128	128	32
28	2	1	0,125	0,03	8	4	2	1
29	0,125	0,125	0,06	0,06	16	8	4	2
30	0,5	0,25	0,06	0,03	8	8	4	2
31	0,5	0,5	0,25	0,25	32	32	16	8
32	1	1	0,25	0,125	64	64	32	16
33	2	1	0,5	0,5	64	64	32	32
34	1	1	0,25	0,125	128	128	64	32
35	0,5	0,5	0,06	0,03	16	8	4	1
36	0,125	0,125	0,06	0,03	8	16	4	2
37	2	1	0,5	0,5	>128	>128	128	64
38	0,25	0,125	0,06	0,06	8	8	4	1
39	0,125	0,25	0,06	0,03	4	4	2	2
40	0,5	0,5	0,125	0,06	16	8	2	2
41	0,5	0,5	0,25	0,125	16	32	16	8
42	1	1	0,5	0,5	16	16	8	4
43	1	2	0,5	0,25	16	16	8	8
44	2	1	0,25	0,25	64	64	32	16
45	1	0,5	0,25	0,125	64	32	8	4
46	2	1	0,5	0,125	32	64	16	4
47	0,5	0,5	0,25	0,125	16	16	8	4
48	0,25	0,125	0,06	0,03	4	4	2	1
49	0,25	0,25	0,06	0,03	4	4	2	1
50	0,125	0,25	0,06	0,06	16	16	8	2

Tabelle 22: MHK-Bereiche des ersten und sechsten Tages von BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin für *E. cloacae.*

4.3.4.2 Resistenzentwicklung von Enterobacteriaceae gegenüber BMS-284756 und verschiedenen Chinolonen

Um die Resistenzentwicklungsrate analysieren zu können, überführten wir die MHK-Werte aller ursprünglichen klinischen Isolate und aller selektierten Mutanten der Tage 1, 2, 3, 4, 5, und 6 in eine logarhithmische Skala. Die Ausgangs-MHK-Werte am Tag 0 wurden von den folgenden MHK-Werten der Tage 1-6 subtrahiert. Die Steigung des MHK-Anstiegs über die 6 Tage wurde mittels linearer Regression berechnet und verglichen, indem eine ANOVA mit Student-Newman-Keuls post hoc Test verwendet wurde: die Vergleiche wurden als statistisch signifikant erachtet bei $p < 0,05$ (16).

Da die Ergebnisse bezüglich der Resistenzentwicklung für die drei getesteten Spezies nahezu identisch waren (+/- 5%), schien eine Zusammenführung der erfassten Daten für alle 150 getesteten Isolate sinnvoll. Für alle 3 Spezies konnten für BMS und Moxifloxacin nahezu identische Linien gefunden werden; beide Substanzen wiesen relativ höhere $\log_2$ -MHK-Anstiege nach 6 Tagen auf (BMS:: 4,5±0,13; Moxifloxacin: 4,4±0,16) als Levofloxacin (3,01±0,15) und Ciprofloxacin (2,34±0,14). Die Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit war also signifikant unterschiedlich für die getesteten Substanzen. Eine grafische Darstellung erfolgt in Abbildung 24.

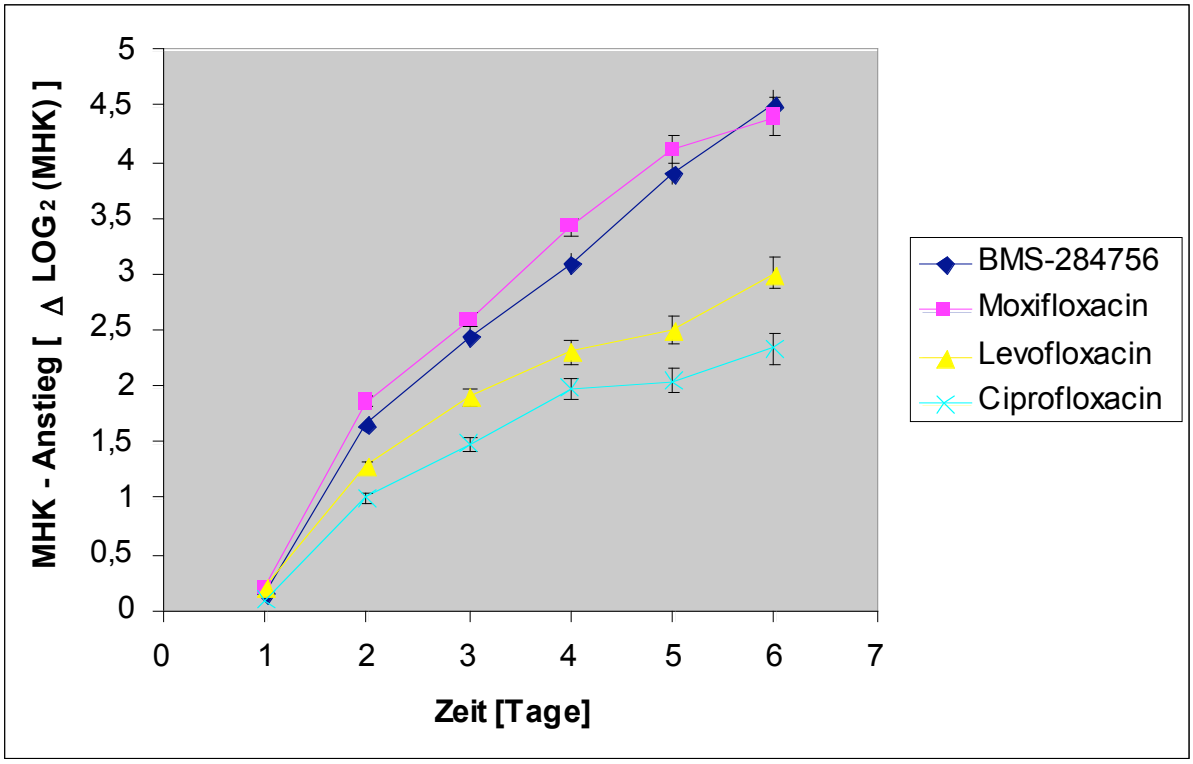


Abbildung 24: Anstiege der MHK-Werte relativ zu den individuellen Ausgangswerten während 6 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM für N = 50 Stämme.

Diese Unterschiede, die mittels der logarithmischen Skala gemessen werden, korrespondieren mit dem x-fachen Anstieg der initialen MHK-Werte pro Tag: CIP 1.32-fach, LEV 1.32-fach, MOX 1.72-fach und BMS 1.74-fach. Folglich zeigten CIP und LEV, die zwei Chinolone mit der höchsten in-vitro-Aktivität gegen die getesteten Isolate, die geringste Neigung zur Auslösung von Resistenzentwicklung. In Abbildung 25 ist die Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung der Enterobacteriaceae gegenüber den verschiedenen Chinolonen dargestellt.

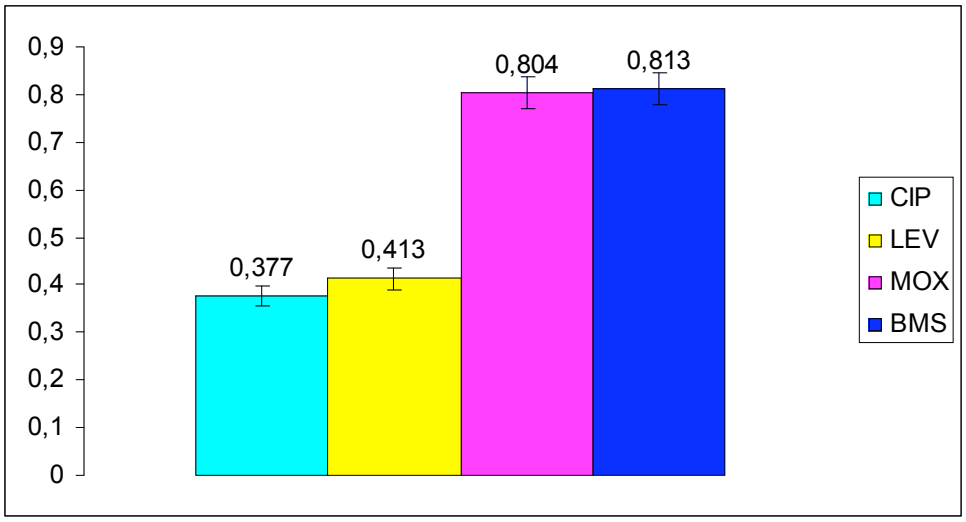


Abbildung 25: Geschwindigkeiten der Resistenzentwicklung dargestellt anhand der Steilheiten der individuellen zeitabhängigen MHK-Anstiege. Mittelwerte ± SEM sind abgebildet. CIP und LEV zeigen die geringsten MHK Anstiege mit Raten, die im Mittel kleiner als 0,4-log2 Einheiten pro Tag betragen (entsprechend einem 1.32-fachen Anstieg pro Tag), während BMS die höchste mittlere Anstiegssteilheit mit größer 0,8-log2 Einheiten pro Tag aufweist (entsprechend einem 1.78-fachen Anstieg pro Tag).
BMS: BMS-28475;, LEV: Levofloxacin; MOX: Moxifloxacin; CIP: Ciprofloxacin

Die Subkultivierung in Anwesenheit der 4 Chinolone führte zum Anstieg der MHK-Werte in allen getesteten Stämmen nach 6 Durchgängen. Die Resistenz erwies sich in jedem Fall als stabil, d.h. die MHK-Werte der selektierten Mutanten blieben innerhalb einer doppelten Verdünnungsstufe, nachdem diese mehrfach auf Chinolon-freien Agar transferiert worden waren. Ähnliche Ergebnisse waren bereits von Davies *et al.* für *S. pneumoniae* und Ciprofloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin und Trovafloxacin berichtet worden.
Basierend auf diesen Resultaten zeigten Ciprofloxacin und Levofloxacin die besten in-vitro-Aktivitäten sowohl gegen sämtliche 150 Chinolon-empfindliche Isolate als auch gegen gegen die 900 selektierten Mutanten der 3 getesteten Spezies, gefolgt von Moxifloxacin und BMS.
Die MHK90-Werte für diese Population von 1050 untersuchten *Enterobacteriaceae* betrugen 4 µg/ml für Ciprofloxacin, 8 µg/ml für Levofloxacin und 16 µg/ml für Moxifloxacin und BMS. Diese Reihenfolge der Aktivität der verschiedenen Chinolone bestätigt die Ergebnisse früherer Studien. (Blondeau *et al.*, 2000; Fung-Tomc *et al.*, 2000; Milatovic *et al.*, 2000; Ta-

kahata *et al.*, 1999). Folglich besteht eine ausgedehnte Kreuzresistenz zwischen den verschiedenen Chinolonen, welche zeigt, dass die beobachteten Mutationen die Aktivität aller Chinolone beeinflussen.
Hauptsächlich klassische Alterationen in *gyrA* (an *Ser83* und *Asp87* in allen getesteten Spezies) und in *parC* (an *Ser79* und *Asp83* in *E. coli* und an *Ser84* und *Glu88* in *K. pneumoniae* und *E. cloacae*) trugen zur Resistenzentwicklung bei den meisten Mutanten bei. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden zwischen den Mutanten der verschiedenen Chinolone. Andere Autoren haben bereits ähnliche Mutationen in den QRDRs beschrieben, die zu Resistenz gegenüber Fluorchinolonen bei den meisten Enterobakterien geführt haben (Alarcon *et al.*, 1993; Deguchi *et al.*, 1997; Deguchi *et al.,* 1997; Dimri *et al.*, 1990; Heisig *et al.*, 1993; Weigel *et al.*, 1998). Tatsächlich konnten signifikante und identische Mutationen sowohl in routinemäßig untersuchten klinischen Isolaten als auch in im Labor angezüchteten Mutanten charakterisiert werden, die entweder durch Fluorchinolon-Selektionsdruck oder durch Transformation hervorgerufen wurden. Veränderungen in *gyrB* und *parE* konnten nicht eindeutig mit den erhöhten MHK-Werten in Verbindung gebracht werden.

Zusammengefasst zeigt dieser Teil der Arbeit, dass die sequentielle Subkultivierung mit subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen Chinolonen, wie BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin zur Resistenzentwicklung in *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae* führt. Ciprofloxacin und Levofloxacin wiesen sowohl die höchsten in-vitro-Aktivitäten gegen alle Chinolon-empfindlichen Isolate und gegen Chinolon-resistente Mutanten als auch die geringste Neigung zur Entwicklung von Resistenzen auf, gefolgt von Moxifloxacin und BMS. Hauptsächlich klassische Mutationen in *parC* und *gyrA* trugen zur Resistenzentwicklung bei den meisten Mutanten bei.

5 Diskussion und Ausblick

Die zunehmende Ausbildung und Verbreitung resistenter Stämme bei der klassischen Behandlung von Infektionskrankheiten mit Antibiotika stellt ein schwerwiegendes Problem dar. Dies kann dramatische Auswirkungen haben, wenn beispielsweise bei schwer verlaufenden Erkrankungen, wie sie durch *S. aureus*, *S. pneumoniae* oder Enterobakterien hervorgerufen werden können, die antibiotische Therapie unwirksam bleibt.

Besondere Bedeutung bei der Ausbildung von Multiresistenzen kommt den Methicillin-resistenten *S. aureus* sowie den Penicillin-resistenten Pneumokokken zu (Schmitz *et al.,* 1998; Tomasz *et al.,* 1997). Das heißt, dass Resistenzen gegenüber den verschiedenen Antibiotikaklassen oftmals in Kombination auftreten, wobei jedoch unterschiedliche Resistenzmechanismen wirksam werden. Da Chinolone neben den β-Laktam-Antibiotika einen Hauptpfeiler in der Therapie von Infektionen ausgelöst durch *S. aureus* und *S. pneumoniae* darstellen, wurde versucht, eine möglichst aktuelle Analyse der Resistenzlage vorzunehmen und die Verbreitung der zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Die häufige Assoziation der Chinolon-Resistenz mit den Problemkeimen MRSA und Penicillin-resistenten Pneumokokken konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Besorgniserregend war außerdem, dass, obwohl die Resistenzausbreitung bei Pneumokokken noch nicht so stark ausgeprägt ist, eine stetige Zunahme von resistenten Stämmen zu verzeichnen ist. So wurde kürzlich vom Auftreten eines klinischen *S. pneumoniae* Isolates mit einer ausgeprägten Resistenz gegenüber Telithromycin (MHK: 256 µg/ml) und ähnlichen Resultaten gegenüber Fluorchinolonen berichtet (Faccone *et al.,* 2005).

Dies macht auch weiterhin eine genaue Überwachung der Resistenzausbreitung nötig, wobei gleichzeitig effektive Maßnahmen zur Bekämpfung einer weiteren Ausbreitung getroffen werden müssen.

5.1 S. aureus, S. pneumoniae, Enterobacteriaceae und die Fluorchinolone

Die bakteriellen Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV stellen die Hauptangriffsziele der Chinolonantibiotika dar. Zur Resistenzentwicklung kommt es durch Veränderungen in den QRDR, den quinolone-resistance-determining-regions, der entsprechenden Gene, wobei Mutationen in den Genen für die A-Untereinheiten entscheidend sind. Bei sämtlichen bisher untersuchten Spezies sind die Mutationen an vergleichbaren Stellen im Gen lokalisiert, den sogenannten „hot spots“ um Codon 80. Ein die Resistenzentwicklung verstärkender Faktor stellt

der Transport hydrophiler Chinolone aus der Bakterienzelle mittels Effluxpumpensystemen dar. Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, den Grad der Verbreitung Chinolon-resistenter *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und *Enterobactericeae*-Stämme zu erfassen und zu analysieren, welche Mutationen in welchem Maße eine entscheidende Rolle spielen. Ein weiteres Ziel bestand darin, eine Vergleich der Aktivitäten von verschiedenen Fluorchinolonen sowie dem Disfluorchinolon BMS-294756 vorzunehmen und den Einfluss der Effluxpumpe zu untersuchen.

5.1.1 Epidemiologische Resistenzverteilung

Dieser Abschnitt der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Ausmaßes der Resistenzausbreitung gegenüber Fluorchinolonen. Zu diesem Zweck erfolgte die Erfassung der MHK-Werte bei großen Kollektiven von klinischen Pneumokokken- und *S. aureus*-Isolaten und eine anschließende Analyse der erhaltenen Daten.

5.1.1.1 S. aureus

1548 *S. aureus*-Stämme, 369 MRSA sowie 1179 MSSA aus ganz Europa wurden hinsichtlich ihrer MHK-Werte für Trovafloxacin, Gatfloxacin und Ciprofloxacin untersucht und es erfolgte die Ermittlung der MHK50- und MHK90-Werte. Die MRSA erwiesen sich zum größten Teil resistent gegenüber allen getesteten Chinolonen, so dass hier keine regionalen Unterschiede erfasst werden konnten. Die MSSA wiesen je nach Region unterschiedliche Resistenzraten zwischen 0% und 19,3% auf, wobei besonders hohe Resistenzraten in Frankreich, Italien, Portugal, Großbritannien und teilweise in Spanien auffielen. Nach Analyse der Untersuchungsergebnisse kann zusammenfassend gesagt werden, dass Gatifloxacin und Trovafloxacin eine bessere in-vitro-Aktivität gegenüber *S. aureus* zeigten als Ciprofloxacin.
Obwohl deutliche Unterschiede in der Häufigkeit vorkommender resistenter Stämme in den einzelnen Ländern nachgewiesen werden konnten, blieb die relative Aktivität der einzelnen Fluorchinolone in allen teilnehmenden Kliniken gleich. Daraus ersichtlich ist das Problem der Multiresistenzen zwischen den einzelnen Chinolonen innerhalb einer Bakterienspezies. Generell war eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin auch mit erhöhten MHK-Werten gegenüber den neueren Fluorchinolonen assoziiert, was eine geringere Effektivität bei den resistenten Isolaten nach sich zog.
Zur Erklärung der beobachteten regionalen Unterschiede können mehrere Möglichkeiten herangezogen werden. Zum einen sei auf den extensiven Einsatz von antibiotischen Substanzen

in manchen Ländern und Regionen hingewiesen, wodurch ein höherer Selektionsdruck auf die Bakterien ausgeübt wird. In diversen Studien wird die Häufigkeit des Vorkommens fluorchinolon-resistenter Bakterien mit dem vermehrten Einsatz von Antibiotika in Korrelation gestellt. In Fallstudien stellte ein Hauptrisikofaktor für die Isolation ciprofloxacinresistenter Keime die vorangehende Behandlung mit Ciprofloxacin dar (Pena *et al.*, 1995). Weber *et al.* konnten 2003 zeigen, dass eine Exposition gegenüber Levofloxacin oder Ciprofloxacin einen signifikanten Risikofaktor für die Isolation von Methicillin-resistenten *S. aureus* darstellt. Oft ist jedoch das Auftreten resistenter Keime nicht nur im Zusammenhang mit vermehrtem Antibiotikaeinsatz zu beobachten, sondern es wird häufig in bestimmten Kliniken oder auf bestimmten Stationen gefunden. War einmal ein resistenter Klon aufgetreten, stieg durch klonale Verbreitung die Rate der Resistenzen in diesem Klinikum oder auf der jeweiligen Station rapide an (Dalhoff, 1994). Dieser Mechanismus der klonalen Verbreitung könnte zusätzlich zum exzessiven Antibiotikagebrauch in manchen Ländern das regional unterschiedlich häufige Vorkommen ciprofloxacinresistenter *S. aureus*-Stämme erklären.

5.1.1.2 S. pneumoniae

Es erfolgte die Bestimmung der MHK-Werte von 1191 Pneumokokken-Stämmen für Ciprofloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin sowie Grepafloxacin. Dabei stellte sich heraus, dass nur 1,8% dieser Isolate eine verminderte Resistenz gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen, wobei diese Rate bei den anderen Chinolonen noch niedriger war. Im allgemeinen ist das Vorkommen Fluorchinolon-resistenter Pneumokokken in Europa noch relativ selten (Marchese *et al.,* 2000; Milatovic *et al.,* 2000), es sei jedoch darauf hingewiesen, dass in anderen Regionen eine stetige Zunahme der Resistenzhäufigkeit beobachtet wurde (Bacquero *et al.,* 1999; Bacquero *et al.,* 1996). Dies kann bestätigt werden durch die Resultate einer von Bell durchgeführten Studie im Rahmen des SENTRY-Programmes zur Untersuchung von Trends in der Resistenzentwicklung von ambulant erworbenen Atemwegsinfektionen in Australien, Hong Kong, Japan, China, den Philippinen, Singapur, Südafrika und Taiwan (Bell *et al.,* 2002). Dabei stellte sich heraus, dass 40% der *S. pneumoniae*-Isolate resistent gegenüber Penicillin waren, wobei 18% eine high-level Resistenz aufwiesen mit MHK-Werten ≥ 2 mg/l. Die Resistenzraten gegenüber Erythromycin und Clindamycin betrugen 41% und 23% für die jeweilige Substanz. Die Penicillin-resistenten Stämme zeigten hohe Resistenzraten gegenüber anderen antimikrobiellen Substanzen: 96% für Trimethoprim-Sulfamethoxazol, 84% für Tetracyclin und 81% für Erythromycin. Eine geringe Anzahl von Isolaten wiesen eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Levofloxacin (0,7%), Trovafloxacin (0,4%) und Gre-

pafloxacin (1,3%) auf, wohingegene alle Stämme unverändert empfindlich gegenüber Quinupristin/Dalfopristin und BMS-284756 (MHK90-Wert: 0,06 mg/l) waren (Bell *et al.*, 2002). In diesem Fall konnte sich BMS-284756 also deutlich positiv von den älteren Fluorchinolonen absetzen.

Ein Erklärungsversuch für das bisher noch seltene Vorkommen Chinolon-resistenter *S. pneumoniae*-Stämme besteht in der Tatsache, dass Pneumokokkeninfektionen häufig im ambulanten Bereich erworben sind. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass sich die klonale Ausbreitung in Kliniken sehr viel schneller ereignen kann, nämlich aufgrund des intensiven Kontaktes zwischen medizinischem Personal und verschiedenen Patienten (cross-contamination) sowie der räumlichen Enge.

Chinolone spielen eine bedeutende Rolle in der Therapie von Pneumokokkeninfektionen und ihr Stellenwert ist hier weitaus größer als bei *S. aureus*. Aus diesem Grund muß die wenn auch bisher geringe Resistenzrate gegenüber Pneumokokken sorgfältig beobachtet und wirksam bekämpft werden.

5.1.1.3 Enterobacteriaceae

Die Bakterienspezies der *Enterobacteriaceae* stellt im Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber der Substanzklasse der Chinolone keine Ausnahme dar (Alarcon *et al.*, 1993; Bauernfeind *et al.*, 1994; Hooper, 1995). Durch Alterationen im Genlokus *gyrA*, der gemeinsam mit *gyrB* für die Kodierung der DNA-Gyrase verantwortlich ist, wird eine Resistenzentwicklung möglich gemacht (Deguchi *et al.,* 1995; Heisig *et al.*, 1993; Weigel *et al.*, 1998;Yoshida *et al.*, 1990). Dies scheint der hauptsächliche Mechanismus bei den Enterobakterien zu sein, denn Mutationen im Genlokus *parC*, der die Topoismerase kodiert, spielen bei einer großen Anzahl dieser Keime einschließlich *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* wahrscheinlich nur eine sekundäre Rolle (Belland *et al.*, 1994; Deguchi *et al.*, 1997; Deguchi *et al.*, 1997; Deguchi *et al.*, 1996; Khodursky *et al.*, 1995; Kumugai *et al.*, 1996). Erwähnenswert ist jedoch, dass dieser Mutationseffekt nicht für *K. oxytoca* und *E. aerogenes* beobachtet werden konnte.

Um die Wirksamkeit der Fluorchinolone zu verstärken, sollten die neueren Substanzen idealerweise eine verbesserte Aktivität gegenüber Chinolon-resistenten Stämmen mit Alterationen in *gyrA* und *parC* aufweisen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte ein Vergleich der in-vitro-Aktivitäten von Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Trovafloxacin sowie Ciprofloxacin gegenüber diversen *Enterobacteriaceae*-Isolaten mit Charakterisierung der *gyrA*- und *parC*-Gene. Desweiteren wurde eine Analyse der Prävalenz von Mutationen in den

besagten Genen von Stämmen durchgeführt, welche eine repräsentative Sammlung von *Klebsiella spp*. und *Enterobacter spp*. aus dem europäischen Raum darstellen.

5.1.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen

Es erfolgte ein Aktivitätsvergleich diverser Chinolone, wobei vor allem der Einfluss von Resistenzmutationen auf deren Wirksamkeit untersucht wurde. Gleichzeitig wurde die Häufigkeit der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen, nämlich Resistenzmutationen und Effluxpumpe bestimmt.

5.1.2.1 S. aureus

Insgesamt 891 *S. aureus*- Isolate, davon 434 MSSA und 457 MRSA, wurden hinsichtlich ihrer MHK-Werte von Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Clinafloxacin und Sitafloxacin untersucht. Von allen Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurden die MHK-Werte von Ciprofloxacin nochmals in Anwesenheit von Reserpin bestimmt und die Sequenzierung der QRDR von *gyrA* und *parC* durchgeführt. Als Effluxpumpenhemmer verhindert Reserpin die Ausbildung einer Resistenz wegen verringertem Ausstrom der Antibiotika aus der Bakterienzelle.

Sitafloxacin und Clinafloxacin zeigten insgesamt die beste Wirksamkeit gegenüber MSSA und MRSA mit MHK-Werten zwischen ≤0,008 und 8 mg/l beziehungsweise zwischen ≤0,008 und 4 mg/l. Diese beiden Substanzen können also als vielversprechend mit einer guten Aktivität gegen *S. aureus* angesehen werden. Das vorliegende Ergebnis lässt sich durch frühere Studien und vorangegangene Analysen bestätigen (Schmitz *et al.*, 1998, Sierra *et al.*, 2002).

Betrachtet man die verglichen mit den Pneumokokken geringe Anzahl der Stämme, deren MHK-Werte durch Reserpin beeinflusst werden, lässt sich dies folgendermaßen erklären:

Eine Möglichkeit besteht darin, dass Reserpin aufgrund einer Reserpinresistenz unterschiedlich starke Auswirkungen auf die verschiedenen Stämme hat. Dieses Phänomen konnte bereits für Bmr, einen verwandten Efflux-Transporter aus *Bacillus subtilis* beobachtet werden (Ahmed *et al.,* 1993). Ein anderer Erklärungsansatz beinhaltet die variable Expression von *NorA* aufgrund von regulierenden Mutationen in der Region 5' von *norA* (Kaatz *et al.*, 1995). Dieser Mechanismus könnte auch für andere, bis jetzt unbekannte Effluxpumpen in Frage kommen.

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Effekt von Reserpin, nämlich der Verminderung der Resistenz und den gefundenen MHK-Werten oder Resistenzmutationen keine Kor-

relation besteht (Schmitz *et al.*, 1998). Der Efflux-inhibierende Effekt von Reserpin hängt demnach nicht davon ab, ob ein Stamm gegenüber Chinolonen resistent oder sensibel ist.
In circa einem Viertel bis zu einem Drittel aller Isolate konnte die intrazelluläre Konzentration von Ciprofloxacin durch die Zugabe von Reserpin, das bekanntlich Multi-drug-Effluxpumpen hemmt, deutlich angehoben werden. Dies könnte eindeutige therapeutische Vorteile bei Kombination eines Efflux-Hemmers mit einem Fluorchinolon mit sich bringen. Da Reserpin in den benötigten Konzentrationen für den Menschen jedoch toxisch ist, müssten andere Effluxhemmer für diesen Zweck gefunden werden.
Hinsichtlich der gefundenen Mutationen ist hervorzuheben, dass bei den meisten Isolaten lediglich zwei verschiedene Mutationskombinationen auftraten. Es handelt sich um *Ser80Phe* (*grlA*) mit *Ser84Leu* (*gyrA*) in 56% und *Ser80Phe* (*grlA*) mit *Glu88Lys* (*gyrA*) in 21% der Fälle. In *grlA* trat also immer eine identische Mutation auf, wodurch gezeigt werden kann, dass innerhalb Europas nur eine geringe Anzahl von Mutationen wirklich wichtig in der Resistenzvermittlung gegenüber Fluorchinolonen ist. Dies bestätigt frühere Studien, die an kleineren Population vorgenommen wurden (Ferrero *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1994; Takahata *et al.*, 1996; Takenouchi *et al.*, 1995; Yamagishi *et al.*, 1996).

5.1.2.2 S. pneumoniae

427 klinische Pneumokokken-Isolate wurden hinsichtlich ihrer MHK-Werte von Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin untersucht. Die Bestimmung der MHK-Werte wurde in Gegenwart des Effluxpumpenhemmers Reserpin wiederholt, um dessen Einfluß zu ermitteln.
Für die 25 Stämme, deren Ciprofloxacin-MHK-Wert über 2mg/l lag, amplifizierten und sequenzierten wir die QRDR von *gyrA, gyrB, parC* und *parE*. Generell sind die Veränderungen in *S. pneumoniae* an Codon-Position 81 in *gyrA* und an den Positionen 79 und 83 in *parC* lokalisiert. Es wurden außerdem Resistenzmutationen in *gyrB* und *parE* beschrieben, deren klinische Bedeutung aber offenbar minimal ist (Bast *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1999; Pestova *et al.,* 1999). Diese Aussage wird durch die vorliegenden Ergebnisse bekräftigt, da keine Alteration in *gyrB* und lediglich eine Mutation in *parE* (*Ile460Val*) gefunden wurde, die jedoch vergleichsweise geringere Auswirkungen auf die MHK-Werte hatte, als entsprechende Veränderungen in *gyrA* oder *parC*. In der vorliegenden Arbeit wurden die klassichen Alterationen an den sog. „hot spots“ gefunden, nämlich *Ser81Phe* oder *Tyr* in *gyrA* und *Ser79Phe* und *Asp83Asn* in *parC*. Diese Resultate beschreiben die vorherrschenden Mutationen und Mutationskombinationen für klinische Pmeumokokken-

Isolate und sind identisch mit Ergebnissen früherer Untersuchungen dieser Bakterienspezies (Davies *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1998; Janoir *et al.*, 1999; Janoir *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1999; Morosini *et al.*, 2003). Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass anscheinend nur die klassichen, bereits bekannten Mutationen in *gyrA* und *parC* eine signifikante Rolle bei der Vermittlung von Chinolonresistenz spielen und die Veränderungen in *gyrB* und *parE* weniger wichtig sind. Dabei kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen Penicillin- und Chinolonresistenz festgestellt werden.
Eine bedeutsame Entdeckung ist der in-vitro Transfer von Resistenzdeterminanten gegenüber Chinolonen von klinischen *Viridans*-Streptokokken-Isolaten zu Pneumokokken (Janoir *et al.*, 1999). Von besonderem Interesse könnte die Beobachtung der Auswirkung selektiven Drucks auf diese genetischen Systeme durch neuere Fluorchinolone sein. Obwohl die MHK durch Mutationen verglichen mit Stämmen ohne Mutationen deutlich ansteigt, weisen viele dieser Antibiotika noch eine hohe in-vitro-Aktivtät auf.

5.1.2.3 Enterobacteriaceae (E. aerogenes, E. cloacae, K. pneumoniae und K. oxytoca)

Das bereits beschriebene Mutationsmodell für ***Klebsiella spp***., welches besagt, dass bei einigen Isolaten dieser Spezies lediglich Veränderungen im *gyrA*-Gen vorkommen, konnte durch unsere Untersuchungsergebnisse bestätigt werden (Deguchi *et al.*, 1997). Einzelne Mutationen bei *Ser83* in *gyrA* waren stets mit MHK-Werten von ≥2 µg/ml für Ciprofloxacin assoziiert. Kamen zusätzlich Veränderungen bei *Asp87* in *gyrA* oder bei *Ser80* in *parC* vor, hatte dies im allgemeinen eine Erhöhung der MHK-Werte zur Folge. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Mutationen bei *Ser83* in *gyrA* eine entscheidende Rolle für das Auftreten von Chinolonresistenz spielen, wobei zusätzliche Veränderungen nicht unbedeutend sind (Belland *et al.*, 1994; Deguchi *et al.*, 1996; Khodursky *et al.*, 1995; Kumugai *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1990). Dashti *et al.* fanden kürzlich heraus, dass Alterationen in der *gyrA*-Untereinheit der DNA-Gyrase an Postition 83 und/oder 87 eine zentrale Rolle in der Vermittlung der problematischen high-level-Resistenz in *K. pneumoniae*-Isolaten spielen, die ESBLs exprimieren (Dashti *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu den *Klebsiella spp.* wiesen alle europäischen Ciprofloxain- resistenten Isolate der ***Enterobacter spp***. Mutationen in *parC* kombiniert mit einem Aminosäureaustausch in *gyrA* auf. Diese Beobachtung unterscheidet sich von der vorangegangener amerikanischer und japanischer Studien bezüglich *Enterobacter*-Isolaten und legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise eine Verschiebung innerhalb der europäischen Spezies zu Mehrfachmutationen

geführt hat. Zur Erklärung dieses Phänomens könnten außerdem geografische Unterschiede zwischen den japanischen und amerikanischen sowie den europäischen Stämmen herangezogen werden.
Es hat den Anschein, dass kombinierte Mutationen in *gyrA* bei *Enterobacter spp*.-Isolaten nicht zu höheren MHK-Werten führen als Einzelmutationen. Da in der vorliegenden Studie lediglich Isolate untersucht wurden, die sowohl eine Veränderung in *gyrA* als auch in *parC* aufweisen, wird eine Aussage bezüglich der Bedeutung zusätzlicher Mutationen in *parC* zu den bereits vorhandenen Mutationen in *gyrA* erschwert.

Beim Vergleich der in-vitro-Aktivität der neuen Fluorchinolone gegenüber *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Isolaten mit Alterationen in *gyrA* und *parC* stellte sich heraus, dass die MHK-Werte für Clinafloxacin mindestens ein bis zwei Verdünnungsstufen niedriger waren als für das am wenigsten wirksame Chinolon. Clinafloxacin zeigte also die beste in-vitro-Aktivität gegenüber sämtlichen getesteten Spezies. Diese Resultate bestätigen die bereits in vorangegangenen Studien beschriebene verbesserte Wirksamkeit von Clinafloxacin sowohl gegenüber Isolaten, die frei von Mutationen waren, als auch gegenüber Stämmen mit vorhandenen Veränderungen (Bauernfeind, 1997). Es kann also davon ausgegangen werden, dass Clinafloxacin zur Therapie von Erkrankungen ausgelöst durch *Enterobacter aerogenes*- oder *Klebsiella*-Stämme eine klinische Bedeutung erlangen wird. Dies könnte von besonderem Nutzen sein, wenn die Infektion durch resistente Stämme dieser Spezies mit Mutationen in *gyrA* und *parC* hervorgerufen wurde. Allerdings scheint keine verbesserte Wirkung von Clinafloxacin gegenüber resistenten *E. cloacae*-Isolaten zu bestehen.

Auch in Zukunft muss mit einer verstärkten Tendenz zur Resistenzentwicklung von gramnegativen Keimen gerechnet werden. Obwohl Resistenzen gegenüber Chinolonen bisher hauptsächlich durch chromosomale Mutationen ausgelöst werden, kann man davon ausgehen, dass in Zukunft auch bisher wenig ausschlaggebende Resistenzmechanismen an Bedeutung gewinnen werden. In einer von Corkill *et al.* in Großbritannien durchgeführten Studie wurde beispielsweise die Prävalenz des Resistenzgens *qnrA* untersucht, welches für die Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Fluorchinolonen verantwortlich ist (Corkill *et al.*, 2005). Der *qnr*-Lokus (quinolone resistance) kodiert ein Protein, dessen Funktion es ist, die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV vor den Einflüssen dieser antimikrobiellen Substanzen zu schützen. Dabei scheint das Plasmid-vermittelte Chinolonresistenzprotein *QnrA* direkt mit der Topoisomerase IV zu interagieren (Tran *et al.*, 2005). Aufgreinigtes *QnR* blockierte hierbei die

Hemmung der Topoisomerase IV durch Ciprofloxacin. Die gleiche Auswirkung war bereits für die DNA-Gyrase beschrieben worden (Tran *et al.,* 2005). Das *qnrA*-Gen ist eingebettet in ein komplex aufgebautes *sul1*-type-Integron (Nordmann *et al.*, 2005). Kürzlich konnte der Ursprung der *QnrA*-Determinante identifiziert werden, es handelt sich um *Shewanella algae*, eine im Wasser lebende Spezies. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass umfeldbedingte Faktoren eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Resistenzmechanismen spielen. Dieser Resistenzmechanismus wurde erstmals 1994 bei einem *Klebsiella pneumoniae*-Isolat in Birmingham/USA identifziert (Jacoby 2003). Das Vorkommen von *Qnr*-Proteinen (*QnrA*-like, *QnrB* und *QnrS)* konnte weltweit demonstriert werden mit einer besonders hohen Prävalenz in Asien. Auch in Europa konnte bereits eine *E.coli*-Isolat detektiert werden, welches die Plasmid-vermittelten Veränderungen aufwies (Mammeri *et al.*, 2005). Corkill *et al.* gelangten zu dem Ergebnis, dass 32% der getesteten Ciprofloxacin- und Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae*-Isolate dieses Gen aufwiesen. Darunter befanden sich verschiedene Stämme von *E. coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae*. Obwohl die durchschnittliche Prävalenz diese Gens weltweit in diesem Bakterienkollektiv lediglich < 2% beträgt, konnte doch die enorme Wichtigkeit der Untersuchung und Kontrolle neuer Resistenzmechanismen und deren Epidemiologie bekräftigt werden.

Zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Resistenzentwicklung gegenüber Chinolonen und gleichzeitig Beta-Laktamantibiotika könnte das gleichzeitige Vorkommen des Resistenzgens *qnrA* zusammen mit dem erweiterten-Spektrum beta-Laktamase-Gen *bla*(VEB-1) herangezogen werden (Poirel *et al.*, 2005). ESBLs (extended-spectrum-beta-lactamases) konnten phänotypisch in 9% der *E. coli*, 14% der *K. pneumoniae* und 14% der *Enterobacter-spp*.-Isolate nachgewiesen werden, die weltweit von Patienten mit intra-abdominalen Infektionen isoliert worden waren (Paterson *et al.*, 2005). ESBL-produzierende Stämme zeigen generell ein aggressiveres Resistenzentwicklungsprofil als Stämme ohne ESBL (Paterson *et al.*, 2005). Geht die ESBL-Produktion mit einer gleichzeitigen Resistenz gegenüber Ciprofloxacin einher, so schränkt dies die Therapieoptionen für Infektionen durch diesen Keim erheblich ein. In Taiwan stellten sich 18,5% der untersuchten ESBL-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate als resistent gegenüber Ciprofloxacin heraus (MHK ≥4 µg/ml), wobei 95% dieses Bakterienkollektivs eine sogenannte high-level-Resistenz mit MHK-Werten ≥16 µg/ml aufwiesen (Yu *et al.*, 2002). Besorgniserregend ist vor allem, dass die entsprechenden Isolate kreuzresistent gegenüber den neueren Chinolonen sind, darunter auch Levofloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin und BMS-284756.

Auch Multidrug-Effluxpumpen können zur Resistenzentwicklung in gramnegativen Keimen beitragen. So sind bei *Escherichia coli* 3 verschiedene Effluxpupen beschrieben worden, NorE, AcrAB und MdfA, die bei kombiniertem Vorkommen synergistisch zu einer Erhöhung der Resistenzentwicklung führen (Yang *et al.*, 2003).

5.1.3 BMS-284756

Eine Resistenzentwicklung gegenüber Chinolonen ist bei allen grampositiven Kokken in der Klinik zu beobachten. Unterschiede können lediglich in der Tendenz eines bestimmten Chinolons, eine schnellere oder langsamere Resistenzentwicklung der Bakterien auszulösen gefunden werden. Da bereits von einem Versagen der Therapie einer ambulant erworbenen Atemwegsinfektion mit dem neueren Fluorchinolon Levofloxacin berichtet wurde (*Ferrara et al.*, 2005), ist die Suche nach neuen Wirkstoffen absolut essentiell. Es besteht ein dringender Bedarf für die Entwicklung antibakterieller Substanzen, die zum einen den bestehenden Resistenzmechanismen der Bakterien gewachsen sind, und zum anderen das Potential besitzen, als Breitspektrum-Antibiotikum Anwendung zu finden (Roychoudhury *et al.*, 2002). Ein wichtiges Forschungsziel stellt demnach die Identifikation von wirksamen Substanzen mit einem günstigen Resistenzentwicklungsprofil dar. Dies ist unabdingbar für die zukünftige Entwicklung von Antibiotika mit hoher in-vitro-Aktivität und langsamer Resistenzentwicklung.

Von besonderer Bedeutung ist die Untersuchung neuer Substanzen, die eine bessere Verträglichkeit aufweisen. Da in der Vergangenheit Grepafloxacin, Temafloxacin und Trovafloxacin wegen zum Teil schwerwiegender Nebenwirkungen vom Markt genommen werden mussten, kommt der Suche nach hochwirksamen Substanzen mit einem optimalen Nebenwirkungsprofil immer mehr Bedeutung zu. Da vermutet wird, dass die Fluorgruppe am C6-Atom zum Teil für die Unverträglichkeit der neueren Chinolone verantwortlich ist, erfolgte die Entwicklung von Des-F6-Fluorchinolonen, die eine geringere Toxizität bei einer gleichbleibend hohen in-vitro-Aktivität aufweisen sollen. Es wurde bereits von einer herabgesetzten Toxizität bei i.v.-Gabe berichtet (Roychoudhury *et al.*, 2002). Es konnte bereits gezeigt werde, dass diese Substanzen eine eine gute in-vitro-Aktivität gegenüber einer großen Anzahl von Bakterienspezies aufweisen, wobei auch Problemkeime wie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) und Penicillin-resistente *S. pneumoniae* (PRSP) impliziert sind. Eine gute Wirksamkeit konnte außerdem gegenüber *Mycoplasma*- und *Ureaplasma*-Spezies, welche zum Teil resistent gegenüber Fluorchinolonen waren, sowie gegenüber *Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis* und *Pasteurella spp.* nachgewiesen werden (Goldstein *et al.*, 2002; Malay *et al.*, 2003; Perey-

re *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung eines Kollektivs von *Gardnerella vaginalis* stellte sich BMS als wirksam auch gegenüber der Isolate heraus, die teilweise resistent gegenüber Metronidazol und Doxycyclin waren (Goldstein *et al.*, 2002). BMS-284756 gehört zur Substanzgruppe der Des-F6-Fluorchinolone und bisher durchgeführte MHK-Studien belegen eine sehr hohe in-vitro-Aktivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Spezies (Edmiston *et al.*, 2005). Wie durch unsere Untersuchungen bestätigt werden konnte, ist es in seiner Aktivität gegenüber Streptokokken und Staphylokokken sogar überlegen gegenüber Fluorchinolonen der Gruppe IV (Entenza *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003; Loza *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*,2001; Schedletzky *et al.*, 1999; Zhanel *et al.*, 2003) und stellt daher eine potentielle Therapiealternative dar.

5.1.3.1 Unterschiede in der Resistenzentwicklung von S. aureus, S. pneumoniae und S. pyogenes gegenüber 6 verschiedenen Chinolonen und BMS-284756 im Überblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BMS-284756 und außerdem die C-8-Methoxychinolone eine statistisch signifikant langsamere Resistenzentwicklung gegenüber *S. pneumoniae* und *S. aureus* aufweist als Levofloxacin, Gemifloxacin und Ciprofloxacin. Auch andere Autoren kamen bereits zu diesem Ergebnis (Dahlhoff,1994; Roth). Es sollte jedoch betont werden, dass für alle Chinolone im Laufer der in-vitro-Selektion klinisch resistente Isolate auftraten.

Die hierbei isolierten Mutanten wiesen für alle Fluorchinolone sowie für BMS die üblichen Resistenzmuationen an den „hot spots“ auf (Dong *et al.*,1999; Fitzgibbon *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 1998; Fung-Tomc *et al.*, 2000; Gootz *et al.*, 1999; Gootz *et al.*,1999; Guerin *et al.*, 2000; Janoir *et al.*, 1999; Janoir *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Kaatz *et al.*, 1997; Kaatz *et al.*, 1993; Khodursky *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 1995; Petersen *et al.*, 2001; Philips *et al.*, 1987; Roychoudhury *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2001; Varon *et al.*, 1999). Bei *S. aureus* konnten Aminsäureaustausche an den Positionen 80 (*Ser80Phe* oder *Tyr*) und 84 (*Glu 84Lys* oder *Gly*) in *grlA* und an den Positionen 84 (*Ser84Leu*) und 88 (*Glu88Lys*) in *gyrA* gefunden werden. Bei *S. pneumoniae* zeigten sich Alterationen an den Positionen 79 (*Ser79Tyr, Phe* oder *Ala*) und 83 (*Asp*83*Asn* oder *Gly*) in *parC* und an den Positionen 81 (*Ser81Phe* oder *Tyr*) in *gyrA*. Man weiß bisher wenig über die Resistenzmutationen von *S. pyogenes*. Es konnten folgende Alterationen festgestellt werden: *Ser79Tyr, Phe, Ala* oder *Val; Asp84Asn* und *Ser78Asn* oder *Glu* in *parC* und *Ser81Phe* und *Glu85Lys* oder *Gly* in *gyrA*. Diese Mutationen wurden zum Teil

schon von anderen Autoren beschrieben (Zechiedrich *et al.*, 1997) oder entsprechen den Veränderungen in anderen Streptokokken-Spezies (Fukuda *et al.*, 2001; Gootz *et al.*, 1996; Janoir *et al.*, 2001; Kaatz *et al.*, 1997; Kaatz *et al.*, 1993; Kayser, 1997; Munoz-Bellido *et al.*, 1999; Philips *et al.*, 1987).

Es stellt sich die Frage, warum die oben genannten Substanzen eine langsamere Resistenzentwicklung aufweisen. Vergleicht man die getesteten Chinolone hinsichtlich ihrer Strukturformeln, ist zu erkennen, dass die drei Fluorchinolone mit der schnellsten Resistenzentwicklung (Levofloxcacin, Gemifloxacin und Ciprofloxacin) weniger sperrige Substituenten an C-7 (ein Piperazinylrest oder ein methylierter Piperazinylrest) aufweisen. Sowohl diese Tatsache als auch ihre Hydrophilie machen sie zu optimalen Substraten für Effluxpumpen vpm MFS-Typ (Tankovic *et al.*, 1996). BMS-284756 und die C-8-Methoxy-Chinolone hingegen eignen sich durch ihre schwache Hydrophilie und sperrigen Substituenten an C-7 wenig zum Transport durch diese Effluxpumpen (Philips *et al.*, 1987; Tankovic *et al.*, 1996). Dies könnte die Unterschiede in der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit teilweise erklären.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Reserpin, ein Effluxpumpenhemmer, in der Lage ist, bei Selektionsversuchen mit Ciprofloxacin und Norfloxacin das Auftreten von initialen Mutationen bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* entscheidend zu vermindern (Marham *et al.*, 1999). Daraus kann wiederum geschlossen werden, dass MFS-Transporter zum Überleben resistenter Mutanten beitragen, indem deren MHK-Werte zusätzlich erhöht werden (Aeschlimann *et al.*, 1999; Milatovic *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 1996). In einem in-vitro-Infektionsmodell konnte demonstriert werden, dass Protonenpumpenhemmer, wie z.B. Omeprazol in der Lage sind, die Wirksamkeit von Ciprofloxacin zu steigern. Ihre Anwendung resultierte sowohl in einem schnelleren Absterben als auch in einer langsameren Resistenzentwicklung eines *S. aureus*-Wildtyp-Stammes und eines Stammes mit Überproduktion von *NorA* (Aeschlimann *et al.*, 1999). Besonders während der ersten Tage der in-vitro-Selektionsversuche trägt die gesteigerte Effluxkapazität entscheidend zur Resistenzerhöhung bei, da noch keine Resistenzmutationen vorliegen, bzw. eine einzige Mutation nur eine mäßige Erhöhung des MHK-Wertes nach sich zieht. In der vorliegenden Arbeit zeigte keines der Ausgangsisolate der ***Staphylokokken*** eine Überexpression der *NorA* Effluxpumpe. Diejenigen *S. aureus*-Mutanten, die mit Ciprofloxacin und Gemifloxacin selektiert worden waren, zeigten eine deutliche Beteiligung von Effluxpumpen an der Resistenzentwicklung. Die MHK-Werte wurden durch Zugabe von Reserpin um bis zu 4 Stufen reduziert. Auch bei einigen der mit Clinafloxacin selektierten

Mutanten stellte sich bei Reserpinzugabe eine deutliche Verringerung des MHK-Wertes um bis zu 3 Stufen ein.Vier der sechs Wildtyp-Stämme von ***S. pneumoniae*** wiesen bereits eine signifikante Beteiligung der PmrA Effluxpumpe an der Resistenzentwicklung auf, die MHK-Werte konnten bei Zugabe von Reserpin zusätzlich um bis zu 3 Stufen reduziert werden. Im allgemeinen war keine effluxbedingte Resistenzerhöhung bei ***S. pyogenes*** ersichtlich. Eine Ausnhame stellte lediglich die mit Gemifloxacin selektierten Mutante des Stammes 6SPY dar, hier konnte eine Absenkung des MHK-Wertes um 3 Stufen bei Zugabe von Reserpin festgestellt werden.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch neuere Untersuchungen von Michot *et al.*, die belegen, dass Ciprofloxacin als Substrat für eine Multidrug-Effluxpumpe in J774-Makrophagen fungiert (Michot *et al.*, 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Moxifloxacin anscheinend nicht von diesem Transportmechanismus betroffen ist, wohingegen Levofloxacin und auch BMS-284756 teilweise durch die besagte Effluxpumpe aus der Zelle ausgeschleust werden (Michot *et al.*, 2005). Der Transport durch Effluxpumpen spielt eine entscheidende Rolle bei der Akkumulation verschiedener antibiotischer Substanzen durch J774-Makrophagen.

Die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit lautete aber auch, ob BMS-284756 zukünftig eine breite Anwendung bei der Therapie gegenüber Erregern von Atemwegsinfektionen finden könnte. Die in vitro-Aktivität gegenüber *S. aureus* und *S. pneumoniae* stellte sich durchweg als überlegen gegenüber anderen Chinolnen dar. Es jedoch auch demonstriert werden, dass diese neue Substanz zwar eine langsamere Resistenzentwicklung im Vergleich zu Fluorchinolonen zeigt, es aber trotzdem innerhalb von 10 Tagen zu einer Resistenzentwicklung unter in-vitro-Bedingungen kommt. Die hierbei selektierten Mutanten waren kreuzresistent gegen sämtliche andere Chinolone und wiesen zusätzlich häufig stark erhöhte MHK-Werte gegenüber diesen auf. Da ein ähnlicher Verlauf unter in-vivo-Bedingungen vermutet werden muss, sollte keine unachstsame Anwendung von BMS-284756 in breitem Maßstab erfolgen. Dies könnte die unnötige Beschleunigung der Resistenzentwicklung von *S. aureus* und Pneumokokken gegenüber Chinolonen zur Folge haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BMS-284756 eine gute in-vitro-Aktivität gegenüber Wildtyp-Stämmen von *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* als auch deren selektierte Mutanten aufweist. Diese neue Substanz scheint

kein Substrat für Effluxpumpen darzustellen. Es kann vermutet werden, dass BMS-284756 ein ähnliches Potential zur Resistenzentwicklung aufweist wie die C-8-Methoxychinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin.

5.1.3.2 S. aureus und S. pneumonia

Im Gegensatz zu den anderen Fluorchinolonen befindet sich bei BMS kein Fluorligand am C-Atom 6. Da dies eine neuere Entwicklung im Hinblick auf Chinolon-Antibiotika darstellt, war es von besonderem Interesse, die Aktivität dieser neuen Substanz vor allem gegenüber MRSA und anderen Erregern mit problematischen Resistenzphänotypen zu ermitteln. Desweiteren sollte herausgefunden werden, ob BMS ein Substrat für Effluxpumpen darstellt.
Zu diesem Zweck wurden die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Gatifloxain, Moxifloxacin und BMS gegenüber klinischen *S. aureus*- und *S. pneumoniae* gemessen und verglichen. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit diverser Pneumokokkenisolate mit bekannten schwierigen Resistenzphänotypen gegenüber BMS untersucht, wobei eine Wiederholung der MHK-Bestimmung in Anwesenheit von Reserpin sowie eine Amplifizierung und Sequenzierung der QRDR der Resistenzgene vorgenommen wurde.
Für beide untersuchten Spezies, *S. aureus* und *S. pneumoniae*, stellte sich heraus, dass BMS, das Desfluorchinolon, von allen getesteten Substanzen die höchste in-vitro-Aktivität aufwies. Dabei zeigte sich, dass Mutationen, die bei den übrigen Chinolonen zu klinischer Resistenz führten, die MHK-Werte für BMS zwar auch erhöhten, jedoch nicht in der Lage waren, dessen Wirksamkeit aufzuheben.

Hetero-VISA

Desweiteren erfolgte die Erprobung der Wirksamkeit von BMS gegenüber hetero-VISA-Stämmen von *S. aureus* (Geisel *et al.*). In dieser Versuchsreihe wurden sieben Stämme untersucht, die alle dem gleichen klonalen Typ, nämlich dem norddeutschen Epidemiestamm angehörten. Es zeigten sich extrem hohe MHK-Werte für Ciprofloxacin (128 mg/l) und die MHK-Werte für Moxifloxacin und Gatifloxacin betrugen jeweils 2 mg/l und 4 mg/l. Auch in diesem Fall bestätigte sich die Wirksamkeit von BMS mit einem MHK-Wert von 0,5 mg/l bei einem angenommenen Grenzwert für klinische Resistenz von > 1mg/l. Dies belegt, dass BMS selbst gegen die äußerst schwer zu therapierenden hetero-VISA-Stämme eine ausreichende in-vitro-Aktivität aufweist und das Potential für eine Therapiealternative besteht.

S. aureus

Zusammengefasst erwiesen sich alle getesteten *S. aureus*-Isolate (116 unverwandte *S. aureus* und 125 klonal verwandte MRSA) als sensibel gegenüber BMS (MHK ≤1mg/l). Interessant ist jedoch, dass BMS im Vergleich zu anderen Fluorchinolonen weniger durch Mutationen in den QRDR von *gyrA, gyrB* und *grlA*, die mit einer Chinolonresistenz vergesellschaftet sind, berührt war (Schmitz *et al.*, 1998). Im Vergleich mit den anderen Fluorchinolonen zeigte BMS eine erheblich gesteigerte in-vitro-Aktivität gegenüber *S. aureus*, was potentiell nützlich sein könnte in der Therapie von Staphylokokken-Infektionen.

S. pneumoniae

Auch alle untersuchten Pneumokokken-Sämme waren empfindlich gegenüber BMS, dessen MHK-Werte durchweg niedriger waren als die von Moxifloxacin, Gatifloxacin und Ciprofloxacin. Dies bestätigt nochmals die Ergebnisse bereits durchgeführter Studien (Low *et al.*, 2002). Auch hier hatten bekannte Resistenzmutationen geringere Auswirkungen als bei den anderen Substanzen. Das neue Chinolon BMS scheint also auch eine vielversprechende Alternative in der Therapie von durch Pneumokokken ausgelösten Infektionen zu sein.

Reserpin

Die Versuche unter Einbeziehung von Reserpin konnten eindeutig zeigen, dass BMS kein Substrat für die Effluxpumpen NorA in *S. aureus* und PmrA in *S. pneumoniae* darstellt. Auch dieses Ergebnis bedingt einen entscheidenden Vorteil in der Therapie. Avrain *et al.* kamen zu einem ähnlichen Ergebnis als sie diverse *S. pneumoniae* Stämme subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin aussetzten. Dies resultierte in patA/B vermittelten Efflux unabhängig davon, wie stark PmrA im ursprünglichen Isolat vetreten war. Levofloxacin wies eine minimale Reduktion seiner Aktivität durch Effluxpumpen auf, wohingegen Moxifloxacin und BMS unbeeinträchtigt blieben (Avrain *et al.,* 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BMS-294756 im Vergleich zu den anderen sich zur Zeit auf dem Markt befindenden Fluorchinolonen, wie Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin, eine deutlich erhöhte in-vitro-Aktivitätgegenüber *S. aureus* und *S. pneumoniae* aufweist. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien (Bassetti *et al.*, 2002; Christiansen *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2002; Pankuch *et al.*, 2002).

5.1.3.3 Untersuchung der in vitro-Aktivität von BMS-284756 gegenüber einer großen Anzahl S. pneumoniae-Stämmen mit verschiedenen Resistenzphänotypen und verschiedenen anderen Streptokokken-Spezies

Auch in diesem Teil unserer Studie stellte sich das Des-F6-Chinolon BMS-284756 als die wirksamste Substanz gegenüber sämtlichen verschiedenen Streptokokken-Spezies heraus, gefolgt von Moxifloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin. BMS-284756 zeigte außerdem eine signifikante Aktivität gegenüber denjenigen *S. pneumoniae*-Isolate, die nicht empfindlich waren gegenüber routinemäßig verwendete Substanzen zur Bekämpfung von Pneumokokkeninfektionen, z.B. Makrolide, Tetrazykline und Cotrimoxazol. Obwohl einige Mutationskombinationen in *parC* und *gyrA* in der Lage waren, die MHK-Werte sämtlicher Chinolone deutlich anzuheben, blieb BMS doch außerordentlich aktiv mit den höchsten MHK-Werten bei 1.0 mg/l. Daraus kann geschlossen werden, dass dieses neue Chinolon eine vielversprechende antimikrobielle Substanz zur Behandlung von Streptokokken-Infektionen darstellen könnte.

5.1.3.4 E. coli, K. pneumoniae und E. cloacae

Es sollte herausgefunden werden, ob BMS-284756 ähnliche in-vitro-Aktivitäten wie die anderen Fluorchinolone gegenüber diesen drei Bakterienspezies aufweisen würde. Außerdem sollten eventuell existierende Unterschiede in der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit detektiert werden. Zu diesem Zweck inkubierten wir mehrfach 50 Stämme jeder Spezies für 6 Tage mit Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin und BMS.

Bei Betrachtung der MHK-Werte der Ausgangsisolate fiel auf, dass Ciprofloxacin die beste in-vitro-Aktivität bei jeder dieser Spezies aufwies, gefolgt von Levofloxacin und BMS. Moxifloxacin erwies sich als am wenigsten wirksam. Auch andere Arbeitsgruppen waren in der Vergangenheit bereits zu diesem Ergebnis gekommen (Christiansen *et al.*, 2004; Fix *et al.*, 2001).

Im weiteren Verlauf zeigten Ciprofloxacin und Levofloxacin, die zwei Chinolone mit der höchsten ursprünglichen in-vitro-Aktivität gegen die getesteten Isolate, die geringste Neigung zur Auslösung von Resistenzentwicklung, gefolgt von BMS und Moxifloxacin.

Die Resultate früherer Studien bezüglich der in-vitro-Aktivität der verschiedenen Chinolone wurde durch unsere Ergebnisse bekräftigt (Blondeau *et al.*, 2000; Fung-Tomc *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2002; Milatovic *et al.*, 2000; Takahata *et al.*, 1999). Eine ausgedehnte Kreuzresistenz zwischen den verschiedenen Chinolonen scheint wahrscheinlich.

Bei der Charakterisierung der Mutationen in den QRDRs von allen Chinolon-resistenten Mutanten, die innerhalb der 6 Tage selektiert werden konnten, fiel auf, dass zum überwiegenden Teil die klassischen Mutationen in *gyrA* (an *Ser83* und *Asp87* in allen getesteten Spezies) und in *parC* (an *Ser79* und *Asp83* in *E. coli* und an *Ser84* und *Glu88* in *K. pneumoniae* und *E. cloacae*) für die Resistenzentwicklung verantwortlich waren. Auch dies bestätigte die Ergebnisse von früher durchgeführten Studien zur Resistenzlage von Fluorchinolonen und *Enterobacteriaceae* (Alarcon *et al.*, 1993; Deguchi *et al.*,1997; Deguchi *et al.*, 1997; Dimri *et al.*, 1990; Heisig *et al.*, 1993; Weigel *et al.*, 1998). Signifikante und identische Mutationen konnten sowohl in routinemäßig untersuchten klinischen Isolaten als auch in im Labor angezüchteten Mutanten detektiert werden. Sie waren also entweder durch Fluorchinolon-Selektionsdruck oder durch Transformation ausgelöst worden.

Es war bereits aus früheren Studien hervorgegangen, dass die Aktivität von BMS gegenüber *Enterobacter spp.* geringer ist als die von Ciprofloxacin. Studien aus dem asiatisch-pazifischen Raum belegen, dass 9% der Oxacillin-resistenten *S. aureus*-Isolate (ORSA) auch eine Resistenz gegenüber BMS ausprägten. Jones et al. konnten hingegen zeigen, dass BMS sehr effektiv gegenüber Ciprofloxacin-sensiblen *Enterobacteriaceae* ist, wohingegen Ciprofloxacin-resistente Stämme hohe Resistenzraten gegenüber BMS und auch den meisten anderen Fluorchinolonen aufwiesen (Sader et al., 2007). Da BMS offensichtlich kein Substrat für die NorA-Efluxpumpe darstellt (Schmitz *et al.*, 2002), ist diese Entwicklung wahrscheinlich auf Mutationen in beiden Zielenzymen zurückzuführen (Christiansen *et al.*, 2004). BMS fungiert nämlich als ein „dual targeting quinolone“ d.h., dass es sowohl die Toposiomerase IV als auch die Gyrase als Angriffziele hat (Ince *et al.*, 2002). Daher bedarf es einer simultan vorliegenden Mutation in diesen beiden Topoisomerasen zum Aufrteten einer Resistenz (Schmitz *et al.*, 2002).

Zusammenfasssend konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung mit subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen Chinolonen, wie BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin definitiv zur Resistenzentwicklung in *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae* führt. Ciprofloxacin und Levofloxacin wiesen nicht nur die größte in-vitro-Aktivität gegenüber allen drei Spezies auf, sondern zeigten auch die geringste Neigung zur Resistenzentwicklung, gefolgt von Moxifloxacin und BMS. BMS-284756 scheint also nur wenig geeignet zur routinemäßigen Anwendung bei Infektionen ausgelöst durch diese *Enterobacteriaceae* spp.. Die altbewährten Präparate Ciprofloxacin und Levofloxacin zeigten sich in diesem Zusam-

menhang nicht nur als effektiver, sondern wiesen zusätzlich Vorteile hinsichtlich ihrem Potential zur Auslösung einer Resistenzentwicklung auf.

5.2 Ausblick

Vor allem gegenüber *Streptococcus pneumoniae*-Isolaten, die bereits eine Resistenz gegenüber anderen Chinolonen, wie Levofloxacin aufweisen, scheint BMS-284756 eine hochwirksame Substanz zu sein, die auch zur breiten Anwendung geeignet ist (Jones *et al.*, 2004). Seine gute Wirksamkeit gegenüber multi-drug-resistant (MDR) Pneumokokken macht es zu einer exzellenten Alternative in der Behandlung von ambulant erworbenen Pneumonien (Jones et al., 2007). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass BMS-284756 eine gute in-vitro-Aktivität gegenüber einem breitem Spektrum weltweit vorkommender bakterieller Spezies aufweist (Bassetti *et al.*, 2002; Biedenbach *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2004; Fung-Tomc *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 1999). Hervorzuheben sind vor allem seine hervorragende Wirksamkeit gegenüber Methicillin-resistenten als auch sensiblen Staphylokokken (Fung-Tomc *et al.*, 2002), und die hauptverantwortlichen Erreger von Atemwegsinfektionen *Streptococcus pneumoniae* (Pankuch *et al.*, 2002), *Hamophilus influenzae und Moraxella catarrhalis* (Gales *et al.*, 2001).

Das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegenüber Antibiotika ist ein ernstzunehmendes Problem. Die generell bevorzugte Verwendung von älteren Chinolonen, wie beispielsweise Ciprofloxacin zur Therapie von Streptokokken-Infektionen, soll die Entwicklung von Resistenzen gegenüber neueren Substanzen verzögern. Es konnte jedoch in einer kürzlich von Jumbe *et al.* durchgeführten Studie gezeigt werden, dass die Anwendung von Ciprofloxacin in vivo die unmittelbare Selektion von Levofloxacin-resistenten Mutanten in einem sich anschließenden Experiment nach sich zog. Die selektierten Mutanten wiesen zum größten Teil keinerlei Veränderungen in *parC/parE* und *gyrA/gyrB* auf, sie zeigten jedoch eine Überexpression der Effluxpumpe. Obwohl dies nur einen geringen Anstieg des MHK-Wertes für Levofloxacin auslöste, bedingte es doch einen signifikanten Anstieg der Mutationsrate gegenüber dieser Substanz. Dies hatte zur Folge, dass Levofloxacin-resistente Stämme in einem darauffolgenden in-vivo-Experiment isoliert werden konnten. Um die Empfindlichkeit von *S. pneumoniae* gegenüber neuren Chinolonen nicht zu gefährden, sollte die Anwendung von Ciprofloxacin zur Therapie von ambulant erworbenen respiratorischen Infektionen minimiert werden (Jumbe *et al.,* 2006).

Desweiteren kann Resistenzentwicklung häufig mit einer supoptimalen Dosierung der antibiotischen Substanz in Verbindung gebracht werden. Dies resultiert in einem vorwiegendem Abtöten der sensiblen Bakterienpopulationen und verienfacht so die Vermehrung von resistenten Stämmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber einer antibiotischen Substanz in Dosierungen gerade unterhalb eines ermittelten Messpunktes zu einem verstärkten Wachstum der resistenten Subpopulationen führte, wohingegen Dosierungen ≥des Messpunktes diese Entwicklung verhinderten (Tam *et al.*, 2005). Dieser Ansatz erlaubt die genaue Darstellung der optimalen Zieldosis (Fläche unter der Konzentrations-/Zeit- Kurve über 24h: minimale Hemmkonzentration {AUC(24) : MIC = 190}, welche die Amplifikation von Antibiotika-resistenten Bakterienisolaten hinreichend unterdrückt und somit die Empfindlichkeit der Spezies gegenüber der Substanz aufrechterhält (Tam *et al.*, 2005). Ein von Hansen *et al.* untersuchter neuer Parameter stellt die Mutanten-Preventionskonzentration MPK (mutant-prevention concentration MPC) dar. Er dient der Minimierung der Selektion von resistenten Mutanten in großen heterogenen Bakterienpopulatonen (Hansen *et al.*, 2005). Diesen Parameter und das neue Des-F6-Chinolon BMS betreffend, gelang Zhao *et al.* eine wichtige Entdeckung. Die MHK- und MPK-Werte von BMS-284756 gegenüber sowohl Ciprofloxacin-sensiblen als auch resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten wurden bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass BMS gegenüber den Ciprofloxacin-sensiblen Stämmen eine 20-fach höhere in-vitro-Aktivität besaß im Vergleich zu Ciprofloxacin, wobei einige dieser Isolate eine Methicillinresistenz aufwiesen. Auch der MPK-Wert bewegte sich bei 90% der getesteten Isolate innerhalb der mit der empfohlenen Dosis erreichbaren Serumkonzentration für BMS. Das bedeutet, dass BMS-284756 nur eine geringe Neigung aufweist, Fluorchinolon-resistente Mutanten aus einem Kollektiv von Ciprofloxacin-sensiblen *S. aureus*-Stämmen zu selektieren. Bei den Ciprofloxacin-resistenten Isolaten hingegen befand der MHK90-Wert ebenfalls unterhalb der Serumkonzentration von BMS, nicht aber der MPK90-Wert. Daher muss angenommen werden, dass sich die BMS-Konzentrationen für diese Bakterienstämme innerhalb eines Bereiches bewegen, in dem die Selektion von Mutanten weitestgehend ermöglicht wird. Als Konsequenz würde die Anwendung von BMS zur Vermehrung von Mutanten mit sogar noch stärker herabgesetzter Empfindlichkeit gegenüber den Chinolonen führen. Als Konsequenz ist BMS also nicht zu empfehlen zur Behandlung von durch Ciprofloxacin-resistente Keime ausgelösten Infektionen, da dies die Resistenzentwicklung gegenüber der Gruppe der Chinolone entscheidend beschleunigen könnte. Yamazaki *et al.* untersuchten die Wirksamkeit von BMS, Gatifloxacin und Moxifloxacin gegenüber Makrolid-resistente und –sensible *M. pneumoniae*-Isolate. BMS zeigte eine exzellente Wirksamkeit mit höheren in-

vitro-Aktivitäten als Gatifloxacin und Moxifloxacin. Es scheint eine potentielle Alternative zu Makroliden in der Behandlung von ambulant erworbenen Pneumonien darzustellen (Yamazaki *et al.*, 2007).
Da sich das Desfluorchinolon BMS-284756 auch in seiner Pahrmakokinetik von den herkömmlichen Fluorchinolonen unterscheidet, ergeben sich neuartige Anwendungsgebiete. Aufgrund der exzellenten in-vitro-Aktivität von BMS und einer nachgewiesenen guten Penetration in die zerebrospinale Flüssigket beispielsweise, scheint es eine vielversprechende Alternative zur Behandlung der durch Pneumokokken verursachten Meningitis zu sein (Cottagnoud *et al.*, 2003). Eine interessante neue Therapiestrategie stellt hier vor allem die synergistische Wirkung von BMS zusammen mit Vancomycin und Betalakatmantibiotika wie Ceftriaxon, Cefotaxim und Meropenem gegenüber Penicillin-resistenten Pneumokokken bei der Bekämpfung von Meningitis bei Kaninchen im Tierexperiment dar (Cottagnoud *et al.*, 2003). In einer in Dallas/USA durchgeführten Studie stellte sich die Therapie einer durch Vancomycin-resistenten Pneumokokken ausgelösten Meningitis mit sowohl Moxifloxacin als auch BMS-284756 als ebenso effektiv dar, wie die Behandlung mit einem Vancomycin-Ceftriaxon-Kombinationspräparat (Rodriguez-Cerrato *et al.*, 2003).

Insgesamt weiß man bisher wenig über die Wirkung von Chinolonen gegenüber intrazellulären Keimen. Es ist bekannt, dass Chinolone in eukaryontischen Zellen akkumulieren und eine große Anzahl intrazellulärer Bakterienspezies attackieren; systmatische Untersuchungen zur Klärung der genauen pharmakodynamischen Hintergründe fehlen jedoch. Eine Arbeit von Seral *et al.* beschäftigte sich mit dem Vergleich der intrazellulären und extrazellulären Aktivität von BMS-284756, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin (Seral *et al.* 2005). Die intrazelluläre Aktivität der untersuchten Substanzen war hierbei um das 5-10-fache herabgestezt für *L. monocytogenes* und sogar 100-fach für *S. aureus* verglichen mit der extrazellulären Aktivität. Moxifloxacin und BMS stellten sich am wirksamsten gegenüber diesen Spezies dar, gefolgt von Levofloxacin und Ciprofloxacin. Dies ist wahrscheinlich auf deren niedrigere MHK-Werte und höher Akkumulationsraten zurückzuführen (Seral *et al.*, 2005). Zur Erklärung der herabgestzten Chinolonaktivität innerhalb der Zelle können verschiedene Erklärungsmodelle herangezogen werden. Es könnte bedeuten, dass nur eine bestimmte Fraktion der zell-assoziierten Chinolone einen antibakteriellen Effekt hat. Auch die umgebenden Faktoren im Zellinneren könnten Einfluss auf die Wirksamkeit nehmen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass intrazelluläre Bakterienspezies generell nur wenig empfänglich für die Angriffstaktiken von Chinolonen sind.

Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet wurde in einer von Desphande *et al.* durchgeführten Studie aufgezeigt. Hier wies BMS-284756 eine sehr gute Aktivität (MHK50Werte um 0,03 mg/l) gegenüber *N. gonorrhoeae* auf, wobei auch Ciprofloxacin-resistente Stämme in die Untersuchungen einbezogen wurden. BMS stellt also eine potentielle Alternative zur medikamentösen Therapie der Gonorrhoe dar (Desphande *et al.*, 2001). Fritsche et al. wiesen auf die exzellente Wirksamkeit von BMS gegenüber häufige Erreger von Haut- und Weichteilinfektionen hin (Fritsche et al., 2007).
Es sollte jedoch auch auf potentielle Einschränkungen und Gefahren bei der Anwendung von BMS-284756 hingewiesen werden. Therapeutische Probleme weisen beispielsweise Infektionen hervorgerufen durch die nicht fermentierenden gram-negativen Keime, wie *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter spp*.auf. Diese Bakterienspezies zeigen eine herabgesetzte intrinsische Aktivität gegenüber zahlreichen antimikrobiellen Substanzen. In einer von Fung-Tomc *et al.* durchgeführten Studie wurde die synergistische Aktivität von BMS-284756 zusammen mit verschiedenen bakterizid wirkenden Substanzen, die nicht zur Gruppe der Chinolone gehören (z.B.Imipenem, Aztreonam, Ceftazidim) nachgewiesen. Diese Kombinationstherapie war auch dann erfolgreich, wenn die Bakterien bereits intermediäre Resistenzen genenüber eine oder sogar beide der verwendeten Substanzen aufwiesen (Fung-Tomc *et al.*, 2002). Dem muß jedoch gegenübergestellt werden, dass bei Anwendung von lediglich einer antibiotischen Substanz aus der Gruppe der Chinolone, BMS-284756 sich als am wenigsten aktiv gegenüber diesen gram-negativen Problemkeimen darstellte. Ciprofloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin un Gatifloxacin wiesen hier eindeutige therapeutische Vorteile auf (Howard *et al.* 2002).

Da das neue Des-Fluorchinolon BMS-284756 hier von besonderem Interesse war, soll noch etwas genauer auf die Pharmoakodynamik und Pharmakokinetik dieser Substanz eingegangen werden. Der Bedarf für neue wirksame und sichere antibiotische Substanzen steigt vor allem für die häufig vorkommenden ambulant erworbenen respiratorischen Infektionen, wie sie durch *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenza, Haemophilus parainfluenza* und *Moraxella catarrhalis* hervorgerufen werden. In einer von Van Wart *et al.* durchgeführten Studie wurden die Pharmakokinetik und und die Zusammenhänge zwischen der Exposition gegenüber dieser Substanz und dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen sowie die antimikrobielle Aktivität untersucht. Diese wurde anhand der klinischen Heilung und der Eradikation des Erregers bei einem Patientenkollektiv mit ambulant erworbener Pneumonie, akuter Exazerbation einer chronischen Bronchtits oder Sinusitis gemessen. Die Verabeichung von BMS-284756 erfolgte in einer Dosierung von 400 mg einmal täglich für 5 – 10 Tage. Die

Anwendung von BMS-284756 war in keinem Fall mit dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Obwohl die Exposition gegenüber der Substanz für Patienten mit moderater Niereninsuffizienz um ca. 25% erhöht war, scheint dieser Anstieg keine klinische Signifikanz zu haben, da er in keinem eindeutigen Zusammenhang mit dem Auftreten von Nebenwirkungen zu stehen scheint. Die klinischen Heilungs- und Eradikationsraten betrugen für alle vier Bakterienspezies zwischen 90% und 93 %. Es konnte also gezeigt werden, dass 400 mg BMS-284756 einmal täglich eine sichere und wirksame Dosierung für die Behandlung von ambulant erworbenen Atemwegsinfektionen darstellt (Van Wart, 2004). In einer ähnlichen Studie fanden Lopez *et al.* ähnliche Heilungsraten bei akuter bakterieller maxillärer Sinusitis. Die am häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen waren Übelkeit, Diarrhoe, Kopfschmerz und Schwindelgefühl (2-6 %) (Lopez *et al.,* 2007). Von Vorteil ist außerdem, dass BMS-284756 unabhängig von den Mahlzeiten eingenommen werden kann (Gajjar *et al.*, 2002). Die Bioverfügbarkeit von BMS war auch dann gewährleistet, wenn es als zerstoßene Tablette mit oder ohne enterale Ernährung (Osmolite) über eine nasogastrische Sonde verabreicht wurde (Krishna *et al.*, 2007).

Hayakawa *et al.* beschäftigten sich eingehend mit der Metabolisierung von BMS-284756 nach intravenöser oder oraler Administration bei Ratten, Hunden und Affen. Die systemische Absorption nach oraler Gabe war gut, gefolgt von einer unveränderten renalen Exkretion und anschließenden Phase-II-Metabolisierung in allen getesteten Spezies. Die Hauptmetaboliten von BMS stellen dessen Sulfate (M1) und die Glukuronide dar, die zum größten Teil über die Gallenflüsigkeit ausgeschieden werden. Die Bildung von Carbomoyl-Glukuroniden spielt eine eher untergeordnete Rolle (Hayakawa *et al.*, 2003). Die durchschnittliche Halbwertszeit von BMS scheint nicht dosisabhängig zu sein und beträgt zwischen 13 und 18 Stunden (Gajjar *et al.*, 2003). Nicolau *et al.* konnten anhand eines Infektionsmodells in Mäusen die in-vivo-Wirksamkeit von BMS demonstrieren (Nicolau *et al.*, 2003). Außerdem stellte sich heraus, dass die Proteinbindung signifikante Auswirkungen auf die Pharmakodynamik dieser Substanz hat (Nicolau *et al.*, 2003). Eine eingeschränkte Nierenfunktion scheint nicht signifikant von der Gabe von BMS beeinflusst zu werden (Krishna et al., 2007).

In einer weiteren Studie sollte der postantibiotische Effekt (PAE, postantibiotic effect) von BMS-284756 für eine Reihe verschiedener Spezies näher untersucht und quantifiziert werden. Dabei gelangte man zu dem Ergebnis, dass die durchschnittlichen PAE-Werte von BMS für Pneumokokken, Staphylokokken und Enterokokken zwischen 0,3 und 2,2 Stunden betrugen.

Für *Escherichia coli* und *Pseudomonas auruginosa* konnten Werte zwischen 0,9 und 1,6 Stunden festgehalten werden (Pankuch *et al.*, 2003).

Es kann davon ausgegangen werde, dass BMS-284756 nicht nur den gleichen Wirkungsmechanismus aufweist wie die herkömmlichen Fluorchinolone, sondern auch ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften besitzt (Philip *et al.*, 2003). Betrugen die AUC/MIC-Verhältnisse ≥30, konnte von einer suffizienten Eradikation von *S. pneumoniae* im IVPM (in-vitro-pharmakokinetisches Modell) ausgegangen werden, wobei dieser Parameter nicht von verschiedenen Empfindlichkeitsraten beeinflusst wurde (Philip 2003).

Weitergehende Studien zur Pharmakokinetik im Zusammenhang mit der Anwendung während der Stillperiode belegen, dass BMS-284756, wie auch andere Fluorchinolone, in die Muttermilch sezerniert wird (Amsden *et al.*, 2004). Interessanterweise weist BMS eine geringere Toxizität gegenüber wachsendem Knorpelgewebe auf, verglichem mit verschiedenen älteren Fluorchinolonen, wobei noch wenig über den verantwortlichen Mechansimus bekannt ist (Kastner *et al.*, 2004). Obwohl die Serumkonzentrationen und entsprechend Anreicherung von BMS im Gelenkgewebe relativ höher ist verglichen mit Ciprofloxacin und Norfloxacin, konnte doch von einer herabgestzten Gelenktoxizität berichtet werden (Nagai *et al.*, 2002). Im Tierexperiment konnte Shakibaei beweisen, dass BMS-287465, wie auch die älteren Fluorchinolone degenerative Veränderungen in den Achillesehnen juveniler Ratten hervorruft. Das Ausmaß der Schädigung des Sehnengewebes korrelierte hierbei mit der verabreichten Dosis (Shakibaei, 2003). Von besonderem Vorteil erscheint die Tatsache, dass BMS besonders gut im Lungengewebe angereichert wird und die Konzentration über 24 Stunden den MHK 90 Wert für die meisten pathogenen Erreger von Atemwegsinektionen überschreitet (Krishna et al., 2007). Im Hinblick auf kardiotoxische Nebenwirkungen wird im allgemeinen die mehrfache orale Gabe von BMS gut toleriert und bedingte keine signifikanten Veränderungen der QT-Zeit oder der Resultate von psychometrischen Tests (Gajjar *et al.*, 2003), wie dies bei anderen Substanzen der Fall war. BMS zeigte keine relevanten dosis- oder konzentrationsabhängigen Effekte hinsichtlich des korrigierten QT oder PR Intervalls bei einer Dosis von 50 – 1200 mg pro Tag (Wang et al., 2007). Hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils scheint BMS also nützliche Vorteile gegenüber anderen Chinolonen aufzuweisen.
Der Suche nach neueren und besseren Chinolonen sind keine Grenzen gesetzt. Studien von Hoshino *et al.* beschäftigen sich mit DC-159 a, einem neuen 8-Methoxy-Fluorchinolon, und

belegen, dass diese Substanz in vitro zu einem schnelleren Abtöten von chinolon-resistenten *S. pneumoniae* führt als Moxifloxacin und BMS.

6 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae und einige *Enterobacteriaceae* stellen wichtige humanpathogne Erreger dar. Ein besonderes Problem bereiten die sogenannten MRSA, Methicillin-resistente *S. aureus* und Penicilli-resistente *S. pneumoniae*. Diese Keime weisen nicht nur Resistenzen gegenüber allen β-Laktam-Antibiotika auf, sondern führen auch zum Auftreten von Multiresistenzen gegen diverse Antibiotikaklassen. Diese Situation macht die Suche nach neuen wirksamen Substanzen dringend notwendig. Thema der vorliegenden Arbeit sind deshalb die Untersuchung der Resistenzepidemiologie und der Resistenzmechanismen dieser drei Spezies in Bezug auf die die wichtige Antibiotikaklasse der Fluorchinolone. Außerdem soll die in-vitro-Aktivität des neuen Des-F6-Chinolons BMS-284756 und dessen Neigung zur Auslösung von Resistenzen gegenüber den genannten Erregern analysiert werden.

Chinolonresistenz war bei MRSA und penicillinresistenten Pneumokokken besonders verbreitet. Geografisch betrachtet konnten Chinolon-resistente Staphylokokken besonders häufig in Frankreich, Italien, Portugal, Großbritannien und Spanien nachgewiesen werden. Eine Beteiligung der Effluxpumpen war bei ca. 30% der Staphylokokken und bei ca. 50% der Pneumokokken ersichtlich. In klinischen Isolaten wurden die klassischen Mutationen in *gyrA* und *grlA/parC* gefunden, wobei bei sehr vielen Stämmen identische Mutationen vorkamen. Dies bekräftigt die Vermutung für eine klonale, nosokomiale Ausbreitung resistenter Stämme. Die in-vitro-Akitvität diverser Fluorchinolone gegenüber verschiedenen Ciprofloxacin-resistenten und Ciprofloxacin–seniblen *K. oxytoca-, K. pneumoniae-, E. aerogenes*- und *E. cloacae*-Isolaten wurde untersucht. Diese Isolate aus 20 verschiedenen Universitätskliniken waren epidemiologisch unverwandt. Einer Sequenzierung der *gyrA*- und *parC*-Genloki schloss sich eine Korrelation der ermittelten MHK-Werte mit den nachgewiesenen Mutationen an. Unabhängig von den genetischen Veränderungen war Clinafloxacin am wirksamsten gegenüber sämtliche genannten Spezies, außer *E. cloacae*.

BMS-284756, das neue Chinolon, welches keinen Fluor-Liganden an Position 6 trägt, scheint kein Substrat für Effluxpumpen darzustellen und wies hervorrgagende in-vitro-Aktivitäten selbst bei Isolaten mit Alterationen in *gyrA* und *grlA/parC* auf.

Die in-vitro-Aktivitäten von BMS-284756, Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin gegen 248 genetisch festgelegte *S. aureu*s Isolate wurden untersucht, einschließlich 116 unverwandten *S. aureus*, 7 hetero-VISA Stämmen, sowie 125 klonal verwandten MRSA-Stämmen. Alle Stämme waren empfindlich gegenüber BMS bezogen auf einen ermittelten

Messpunkt von 1mg/L. Reserpin reduzierte die MHK-Werte von BMS in keinem der getesteten Stämme. Das neue Des-F-6 Chinolon zeigte eine signifikant gesteigerte Aktivität gegen Staphylokokken.

BMS-284756 wurde auch hinsichtlich seiner in-vitro Aktivität gegenüber klinischen Isolaten verschiedener Streptokokken-Spezies im Vergleich mit den Fluorchinolonen Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Levofloxacin untersucht. BMS-284756 zeigte die beste in-vitro Aktivität gegenüber allen getesteten Isolaten, gefolgt von Moxifloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin. Die MHK_{50} und MHK_{90}-Werte für BMS-284756 lagen für Ciprofloxacin-empfindliche Isolate bei 0,06-0,125 und 0,125-0,25 mg/l. Alle Streptokokken-Isolate mit einer herabgesetzten Ciprofloxacin-Empfindlichkeit (MHK ≥ 4 mg/l) wiesen für BMS-284756 MHK-Werte von ≤1 mg/l auf. Ein Transport von BMS-284756 mittels "Multidrug"-Effluxpumpen konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin wurde die Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit von BMS-284756 bei *Streptococcus pneumoniae* im Vergleich zu Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin und Levofloxacin überprüft. BMS-284756 wies die langsamste Resistenzentwicklungs-geschwindigkeit auf, dicht gefolgt von Gatifloxacin.

Die Untersuchung klinischer Isolate grampositiver Kokken aus Europa bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin als Leitsubstanz ergab, dass neu entwickelte Substanzen wie z.B. die C-8-Methoxy-Chinolone Gati- und Moxifloxacin oder das Des-Fluorchinolon BMS-284756 eine höhere Wirksamkeit aufwiesen. Zu entscheiden war jedoch, ob diese Substanzen als eine langfristige Alternative zur breiten Anwendung insbesondere bei Atemwegsinfektionen geeignet sind. Bei der Analyse der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit stellte sich heraus, dass gegenüber sämtlichen Chinolonen eine Resistenzentwicklung mit Selektion klinisch resistenter *S. aureus-, S. pneumoniae*- und *S. pyogenes*-Isolaten eintrat. Die Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit verlief bei Pneumokokken gegenüber Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS statistisch signifikant langsamer verglichen mit anderen Chinolonen. Zu den in Frage kommenden einflussnehmenden Faktoren zählen der Transport hydropholer Chinolone aus der Zelle durch Effluxpumpen vom MFS-Typ, die Targetpräferenz der verschiedenen Chinolone sowie der mögliche Effekt bereits vorhandener Resistenzmutationen. Da auch das Auftreten einer Kreuzresistenz zu den anderen Chinolonen möglich ist, muss von der breiten Anwendung der neuen C-8-Mehoxychinolone und BMS-284756 abgeraten werden, um eine Beschleunigung der Resistenzentwicklung gegenüber allen Chinolonen nicht noch zu beschleunigen.

Die gram-negativen Bakterienspezies betreffend scheint die sequentielle Subkultivierung mit subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen Chinolonen, wie BMS, Moxifloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin zur Resistenzentwicklung in *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae* zu führen. Ciprofloxacin und Levofloxacin wiesen sowohl die höchsten in-vitro-Aktivitäten gegen alle Chinolon-empfindlichen Isolate und gegen Chinolon-resistente Mutanten als auch die geringste Neigung zur Entwicklung von Resistenzen auf, gefolgt von Moxifloxacin und BMS. Hauptsächlich klassische Mutationen in *parC* und *gyrA* trugen zur Resistenzentwicklung bei den meisten Mutanten bei. Folglich ist das neue Des-Fluorchinolon BMS-284756 kaum zur Therapie von Erkrankungen, die durch *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae* hervorgerufen werden, geeignet. Die gefundenen Resultate legen die Vermutung nahe, dass die in-vitro-Aktivität dieser Substanz gegenüber den erwähnten Keimen nicht ausreichend sein könnte. Außerdem schein eine relativ rasche Resistenzentwicklung bei ausgedehnter Anwendung unvermeidlich zu sein.

Zusammenfassend erfolgte eine detaillierte Analyse der Resistenzepidemiolgie und der Resistenzmechanismen bei europäischen humanpathogenen Erregern sowie eine Evaluation neuer Therapieoptionen.

7 Literatur

AESCHLIMANN J.R.; L.D. Dresser, G.W. Kaatz and M.J. Rybak (1999). Effects of *NorA* inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 335-340.

ACAR, J.F.; T.F. O´Brien, F.W. Goldstein and R.N. Jones (1993). The epidemiology of bacterial quinolone resistance. Drugs 45 (3): 24-28.

AHMED, M.; C.M. Borsch, A.A. Neyfakh and S. Schuldiner (1993). Mutants of the Bacillus subtilis multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. J. Biol. Chem. 268: 11086-11089.

ALARCON, T.; J. Pita, M. Lopez-Brea and L.J. Piddock (1993). High-level-quinolone resistance amongst clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Spain. J. Antimicrob. Chemother. 32: 605-609.

ALBERTS, B.; D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson (1990). Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (235-323).

AMSDEN, G.W.; D.P. Nicolau , A.M. Whitaker, D. Maglio, A. Bello, R. Russo, A. Barros Jr. and D.A. Gajjar (2004). Characterization of the penetration of garenoxacin into the breast milk of lactating women. J. Clin. Pharmacol. Feb, 44 (2):188-92.

ANDEREGG, T.R. and R.N. Jones (2004). Bactericidal activity of garenoxacin tested by kill-curve methodology against wild type and QRDR mutant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Nov, 50 (3): 213-217.

ANDERSON, V.; T. Gootz and N. Osheroff (1998). Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. J. Biol. Chem. 274: 17879-17885.

ANTHONY, B.F. and H.R. Hill (1988). Gram-positive bacteria: an overview and summary of session. Rev. Infect. Dis. 10, Suppl. 2: 45-50.

ARCHER, G.L. (1998). *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26: 1179-1181.

ARCHER, G. L. (1988). Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 2, Suppl. C: 133-138.

ARCHER, G. L. and B. C. Armstrong (1983). Alteration of staphylococcal flora in cardiac surgery patients receiving antibiotic prophylaxis. J. Infect. Dis. 147: 642-649.

AUSTRIAN, R. (1981). *Pneumococcus:* the first hundred years. Rev. Infect. Dis. 3: 183-189.

AVRAIN, L.; M. Garvey, N. Mesaros, Y. Glupezynski, M.P. Mingeot-Leclercq, L.J. Piddock, P.M. Tulkens, R. Vanhoof and F. van Bambeke (2007). Selection of quinolone resistance in Streptococcus pneumoniae exposed in vitro to subinhibitory drug concentrations. J Antimicrob Chemother. Nov;60(5): 965-72.

BASSETTI, M.; L.M. Dembry, P.A. Farrel, D.A. Callan and V.T. Andriole (2002). Antimicrobial activities of BMS-284756 com*parE*d with those of fluoroquinolones and beta-lactams against gram-positive clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:** 234-238.

BAST, D.J.; D.E. Low, C.L. Duncan, L. Kilburn, L.A. Mandell, R.J. Davidson and J.C.S. De Azavedo (2000). Fluorquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*; contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 3049-3054.

BACQUERO, F.; J.A. Garcia-Rodriguez, J. Garcia De Lomas, L. Aguilar and The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens (1999). Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 357-359.

BASSETTI, M; L.M. Dembry, P.A. Farrel, D.A. Callan and V.T. Andriole (2002). Antimicrobial activities of BMS-284756 com*parE*d with those of fluoroquinolones and beta-lactams against gram-positive clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (1): 234-238.

BAUERNFEIND, A. (1997). Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, Gatifloxacin (AM 1155), Trovafloxacin, Clinafloxacin, Levofloxacin and Ciprofloxacin. J. Antimicrob. Chemother. 40 (5): 639-651.

BAUERNFEIND, A.; M. Abele-Horn, P. Emmerling and R. Jungwirth (1994). Multiclonal emergence of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 34 (6): 1074-1076.

BECK, W. D.; B. Berger-Bächi and F. H. Kayser (1986). Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. J. Bacteriol. 165: 373-378.

BELL, J.M.; J.D. Turnidge, R.N. Jones and the SENTRY Regional Participants Group (2002). Antimicrobial resistance trends in community-acquired respiratory tract pathogens in the Western Pacific Region and South Africa: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, (1998-1999) including an in vitro evaluation of BMS-284756. Int. J. Antimicrob. Agents. 19 (2): 125-132.

BELLAND, R.J.; S.G. Morrison, C. Ison and W.M. Huang (1994). *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluorquinolone-resistant isolates. Mol. Microbiol. 14 (2): 371-380.

BETLEY, M. J.; D.W. Borst and L.B. Regassa (1992). Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. Chem. Immunol. 55: 1-35.

BEYER, R.; E. Pestova, J.J. Millichap, V. Stosor, G.A. Noskin, and L.R. Peterson (2000). A convenient assay for the possible involvement of efflux of fluoruinolones by *Strep-*

tococcus pneumoniae and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished Moxifloxacin, Sparfloxacin and Trovafloxacin efflux. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 798-801.

BHAKDI, S. and J. Tranum-Jensen (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev. 55: 733-751.

BIEDENBACH, D. J.; R. N. Jones and M. A. Pfaller (2001). Activity of BMS284756 against 2,681 recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000) in Europe, Canada and the United States. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 39**:** 245-250.

BLONDEAU, J.M.; R. Laskowski, J. Bjarnason and C. Steward (2000). Comparative in-vitro activity of gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin against 4151 gram-negative and gram-positive organisms. Int. J. Antimicrob. Agents 14: 45-50.

BOLON, M.K.; S.B. Wright, H.S. Gold and Y. Carmeli (2004). The magnitude of the association between fluoroquinolone use and quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* may be lower than previously reported. Antimicrob. Agents Chemother. 48(6): 1934-1940.

BOOS M.; S. Mayer, A. Fischer, K. Köhrer, S. Scheuring, P. Heisig, J. Verhoef, A.C. Fluit and F.J. Schmitz (2001). In-vitro development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 938-942.

BRADLEY, S. F. (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Geriatr. Med. 8: 853-868.

BROSKEY, J.; K. Coleman, N.M. Gwynn, L. McCloskey, C. Traini, L. Voelker and R. Warren (2000). Efflux and target mutations as quinolone resistance mechanisms in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 45 (1): 95-99.

BRÜGGEMANN, AB; K.C. Kugler and G.V. Doern (1997). In vitro activity of BAY 12-8039, a novel 8-Methoxyquinolone, com*parE*d to activities of six fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis.* Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1549-1597.

CHEN, C.R.; M. Malik, M. Snyder, and K. Drlica (1996). DNA-Gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA-cleavage. J. Mol. Biol. 258: 627-637.

CHRISTIANSEN K.J.; J.M. Bell, J.D. Turnidge and R.N. Jones (2004). Antimicrobial activities of garenoxacin (BMS 284756) against Asia-Pacific region clinical isolates from the SENTRY program, 1999 to 2001. Antimicrob. Agents Chemother. 48(6): 2049-2055.

CORKILL, J.E.; J.J. Anson and C.A. Hart (2005). High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J. Antimicrob. Chemother. 2005 Dec;56(6):1115-7. Epub 2005 Oct 31.

COTTAGNOUD, P. and M.G. Tauber (2003). Fluoroquinolones in the Treatment of Meningitis. Curr. Infect. Dis. Rep. 5(4): 329-336.

DALHOFF, A. (1994). Quinolone resistance in *Pseudomonas aeroginosa* and *Staphylococcus aureus*. Development during therapy and clinical significance. Infection 22 (2): 111-121.

DASHTI, A.A.; R. Paton and S.G. Amyes (2006). Linkage of ciprofloxacin resistance with a single genotypic cluster of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. Antimicrob. Agents 27(1): 73-76.

DAVIES, T.A.; B.E. Dewasse, M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum (2000). In vitro development of resistance to telithromycin (HMR 3647), four macrolides, clindamycin, and pristinamycin in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 414-417.

DAVIES, T.A.; G.A. Pankuch, B.E. Dewasse, M.R. Jacobs and P. Appelbaum (1999). In vitro development of resistance to five quinolones and amoxicillin-clavunate in *S. pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1177-1182.

DEGUCHI, T.; A. Fukuoka, M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, E. Kanematsu, Y. Nishino, S. Ishihara, Y. Ban and Y. Kawada (1997). Alterations in the *gyrA* subunit of DNA Gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 699-701.

DEGUCHI, T; M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozaki, E. Kanematsu, Y. Nishino, S. Ishihara and Y. Kawada (1997). Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Chemother. 40 (4): 543-549.

DEGUCHI, T.; M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, T. Ezaki, I. Saito and Y. Kawada (1996). Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the *gyrA* subunit of DNA Gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1020-1023

DEGUCHI, T.; M. Yasuda, M. Asano, K. Tada, H. Iwata, H. Komeda, T. Ezaki, I Saito and Y. Kawada (1995). DNA Gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. 39(2): 561-563.

DE LENCASTRE, H.M. and A. Tomasz (1994). Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 2590-2598.

DE LENCASTRE, H. M.; A. M. Sa Figueiredo, C. Urban, J. Rahal, and A. Tomasz (1991). Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 632-639.

DESHPANDE, L.; D.J. Biedenbach and R.N. Jones (2001). Antimicrobial activity of BMS 284756 (T-3811) against *Neisseria gonorrhoeae* tested by three methods.
Int. J. Antimicrob. Agents.18(5): 437-40.

DIMRI, G.P. and H.K. Das (1990). Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic. Ac. Res. 11;18(1): 151-156.

DINGES, M. M.; P.M. Orwin and P.M. Schlievert (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin.Microbiol. Rev. 13: 16-34

DONG Y.; X. Zhao, J. Domagala and K. Drlica (1999). Effect of fluorquinolone concentration on selection of resistent mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1756-1758.

DONG, Y; X. Zhao, B.N. Kreiswirth and K. Drlica (2000). Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2581-2584.

DRLICA, K. (1998). Mechanism of fluorquinolone action. Curr. Opin. Microbiol. 2: 504-508.

DRLICA, K. and X. Zhao (1997). DNA Gyrase, topoisomerase VI and the 4-quinolones. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 61: 377-392.

EDMISTON, C.E. Jr.; C.J. Krepel, K.S. Kehl, G.R. Seabrook, L.B. Somberg, G.H. Almassi, T.L. Smith, T.A. Loehrl, K.R. Brown, B.D. Lewis and J.B. Towne (2005). Comparative in vitro antimicrobial activity of a novel quinolone, garenoxacin, against aerobic and anaerobic microbial isolates recovered from general, vascular, cardiothoracic and otolaryngologic surgical patients. J. Antimicrob. Chemother. 56 (5): 872-878.

EMORI, T.G. and R.P. Gaynes (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Rev. 6: 428-442.

ENTENZA, J.M.; J. Vouillamoz, M.P. Glauser and P. Moreillon (2004). Efficacy of garenoxacin in treatment of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* or *viridans* group *streptococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 48 (1): 86-92.

EVERETT, M.J. and L..V. Piddock (1998). Mechanisms of Resistance to Fluorquinolones. In: J. Kuhlmann, A.Dalhoff, H.J.Zeiler (eds) Quinolone Antibacterials. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

FACCONE, D.; P. Andres, M. Galas, M. Tokumoto, A. Rosato and A. Corso (2005). Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate highly resistant to telithromycin and fluoroquinolones. J. Clin. Microbiol. 43(11): 5800-5803.

FADEN, H. (2001). The microbiologic and immunologic basis for the recurrent otitis media in children. Eur. J. Pediatr. 160: 407-413.

FERRARA, A.M. (2005). New fluoroquinolones in lower respiratory tract infections and emerging patterns of *pneumococcal* resistance. Infection. 33(3): 106-114.

FERRERO, L.; C. Cameron and J. Crouzet (1995). Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1554-1558.

FITZGIBBON, J.E.; D.F. John, J.L. Delucia and D.T. Dubin (1998). Topoisomerase mutations in trovafloxacin-resistant *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2122-2124.

FIX, A.M.; M.A. Pfaller, D.J. Biedenbach, M.L. Beach and R.N. Jones (2001). Comparative antimicrobial spectrum and activity of BMS284756 (T-3811, a desfluoroquinolone) tested against 656 *Enterobacteriaceae*, including preliminary in vitro susceptibility test comparisons and development. Int. J. Antimicrob. Agents. 18(2): 141-145.

FOSTER, T.J.; M. O´Reilly, A.H. Patel and A.J. Bramley (1988). **Genetic studies of *Staphylococcus aureus* virulence factors.** Ant. Leeuw. 54: 475-482.

FOURNIER, B. and D.C. Hooper (1998). Mutations in topoisomerase IV and DNA Gyrase of *Staphylococcus aureus*: novel pleitropic effects on quinolone and coumarin activity. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 121-128.

FRITSCHE, T.H; R.N. Sader and R.N. Jones (2007). Potency and spectrum of garenoxacin tested against an international collection of skin and soft tissue infection pathogens: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1999-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. May;58(1):19-26.

FUKUDA, H.; R. Kishii and M. Hosaka (2001). Contributions of the 8-methoxy-group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1549-1653.

FUKUDA, H. and K. Hiramatsu (1999). Primary targets of fluorquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 410-412.

FUNG-TOMC, J.C.; E. Gradelski, L. Valera, E. Huczko and D.P. Bonner (2002). Synergistic activity of the novel des-fluoro(6) quinolone, garenoxacin (BMS-284756), in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeroginosa* and related species. Int J. Antimicrob. Agents. 20 (1): 57-60.

FUNG-TOMC, J. C.; J. Clark, B. Minassian, M. Pucci, Y.H. Tsai, E. Gradelski, L. Lamb, I. Medina, E. Huczko, B. Kolek, S. Chaniewski, C. Ferraro, T. Washo and D.P. Bonner (2002). In vitro and in vivo activities of a novel cephalosporin, BMS-247243, against methicillin-resistant and -susceptible staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:** 971-976.

FUNG-TOMC, J.C.; B. Minassian, B. Kolek, E. Huczko, L. Aleksunes, T. Stickle *et al.* (2000). Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 3351-3356.

FURET, X.Y.; J. Deshusses and J.C. Pechere (1992). Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmatic membrane in quinolone-susceptible *Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents. Chemother. 36: 2506-2511.

GAJJAR, D.A.; A. Bello, Z. Ge, L. Christopher and D.M. Grasela (2003). Multiple-dose safety and pharmacokinetics of oral garenoxacin in healthy subjects. Antimicrob. Agents Chemother. 47 (7): 2256-2263.

GAJJAR, D.A.; S.C. Sukoneck, A. Bello, Z. Ge, L. Christopher, D.M. Grasela (2002). Effect of a high-fat meal on the pharmacokinetics of the des-F(6)-quinolone BMS-284756. Pharmacotherapy. 22 (2): 160-165.

GALES, A.; H. Sader and R. N. Jones (2001). Activities of BMS 284756 (T-3811) against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae* isolates from SENTRY antimicrobial surveillance program medical centers in Latin America (1999). Antimicrob. Agents Chemother. 45**:** 1463-1466.

GARCIA, E. and R. Lopez (1997). Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. 149: 1-10.

GEISEL, R.; F.J. Schmitz, L. Thomas, G. Berns, O. Zetsche, U. Ulrich, A.C. Fluit, H. Laibischinsky and W. Witte (1999). Emergence of heterogenous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Düsseldorf area. J. Antimicrob. Chemother. 43: 846-848.

GELLERT, M.; R. Menzel, D. Mizuuchi and H. Nash (1983). Regulation of DNA supercoiling in *E. coli*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 763-767.

GELLERT, M.; K. Mizuuchi, M.H. O`Dea, H.A. Nash (1976). DNA Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 3872-3876.

GEORGOPOULOS, A.; R. Schein, A. Buxbaum, S. Tzotzos, A. Hirschl and W. Graininger (1998). Mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. Clin. Microbiol. Infect. 4(2): 75-81.

GILL, M.J.; N.P. Brenwald and R. Wise (1999). Identification of an efflux pump gene, pmrA, associated with fluorquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 187-189.

GILLESPIE, M.T.; B.R. Lyon, L.S.L. Loo, P.R. Matthews, P.R. Stewart and R.A. Skurray (1987). Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 43: 165-171.

GOLDSTEIN, E.J.; D.M.Citron, C.V. Merriam, Y.A. Warren, K.L. Tyrrell and H.T. Fernandez (2002). In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother. 46 (12): 3995-3996.

GOLDSTEIN, E.J.; D.M.Citron, C.V. Merriam, Y.A. Warren, K.L. Tyrrell and H.T. Fernandez (2002). In vitro activities of garenoxacin (BMS-284756) against 170 clinical isolates of nine *Pasteurella* species. Antimicrob Agents Chemother. 46(9): 3068-3070.

GONZALEZ, I.; M. Georgiou, F. Alcaide, D. Balas, J. Linares and A. De La Campa (1998). Fluorquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE* and *gyrA* genes of clinical isolates of *viridans* group *Streptococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2792-2798.

GOOTZ, T.D.; R. Zaniewskki, S. Haskell, F.S. Kaczmarek and A.E. Maurice (1999). Activities of trovafloxacin compared with those of other fluoroquinolones against purified topoisomerases and *gyrA* and *grlA* mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1845-1855.

GOOTZ, T.D.; R. Zaniewski, S. Haskell, B. Schmieder, J. Tancovic, D. Girard, P. Courvalin and R.J. Polzer (1996). Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin against DNA Gyrase and topoisomerase IV mutants of *S. pneumoniae.* Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2691-2697.

GORDON, K. A.; M.L. Beach, D.J. Biedenbach, R.N. Jones, P.R. Rhomberg and A.H. Mutnick (2002). Antimicrobial susceptibility patterns of beta-hemolytic and *viridans* group *streptococci:* report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43**:** 157-162.

GORDON, K.A.; M.A. Pfaller, R.N. Jones and the SENTRY Participants Group (2002). BMS-284756 (formerly T-3811, a des-fluoroquinolone) potency and spectrum tested against over 10,000 bacterial bloodstream infection isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2000). J. Antimicrob. Chemother. 49(5): 851-855.

GUERIN, F.; E.Varon, A. Buu Hoi, L. Gutmann and I. Podglajen (2000). Fluoroquinolone resistance associated with target mutations and active efflux in oropharyngeal colonizing isolates of *viridans streptococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2197-2200.

HANSEN, G.T. and J.M. Blondeau (2005). Comparison of the minimum inhibitory, mutant prevention and minimum bactericidal concentrations of ciprofloxacin, levofloxacin and garenoxacin against enteric Gram-negative urinary tract infection pathogens. J. Chemother. 17(5): 484-492.

HAYAKAWA, H.; Y. Fukushima, H. Kato, H. Fukumoto, T. Kadota, H. Yamamoto, H. Kuroiwa, J. Nishigaki and A. Tsuji (2003). Metabolism and disposition of novel des-fluoro quinolone garenoxacin in experimental animals and an interspecies scaling of pharmacokinetic parameters. Drug Metab. Dispos. 31(11): 1409-18.

HEISIG, P. (1997). Fluorchinoloncarbonsäuren. Arzneimitteltherapie Jahrgang 15; Heft 1: 14-22.

HEISIG, P. (1996): Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high level fluorquinolone resistance in *E. coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 879-885.

HEISIG, P. (1994). Mechanismen bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika. Arzneimitteltherapie 12: 203-218.

HEISIG, P.; H. Schedletzky and H. Falkenstein-Paul (1993). Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluorquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 696-701.

HIASA, H.; D. Yousefs and K.J. Marians (1996). DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone ternary complex. J. Biol. Chem. 42: 26424-26429.

HIRAMATSU, K., N.; H. Aritaka, S. Hanaki, Y. Kawasaki, S. Hosoda, S. Hori *et al.* (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1670-1673.

HOELLMANN, D.B.; L.M. Kelly, M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum (2001). Comparative anti-anaerobic activity of BMS-284756. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 589-592.

HOLM, S.E. (1982). Gram-positive microorganisms in sepsis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 31: 68-77.

HOOPER, D.-C. (1998). Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin. Infect. Dis. 27 (1): 54-63.

HOOPER, D.-C. (1995). Bacterial resistance to fluoroquinolones: mechanisms and patterns. Adv. Exp. Med. Biol. 390: 49-57.

HOSHINO, K.; K. Inoue, Y. Murakami, Y Kurosaka, K. Namba, Y. Kashimoto, S. Uoyama, R. Okumura, S. Higuchi and T. Otani (2007). In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of DC-159a, a New Fluoroquinolone. Antimicrob. Agents Chemother. October 15 (Epub).

HOWARD, W.; D.J. Biedenbach and R.N. Jones (2002). Comparative antimicrobial spectrum and activity of the desfluoroquinolone BMS284756 (T-3811) tested against non-fermentative Gram-negative bacilli. Clin. Microbiol. Infect. 8(6): 340-344.

INCE, D., X. Zhang, L. C. Silver and D. C. Hooper (2002). Dual targeting of DNA Gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a new desfluoroquinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:** 3370-3380.

ITO, H.; H. Yoshida, M. Bogaki-Shonnai, T. Niga, H. Hattori and S. Nakamura (1994). Quinolone resistance mutations in the DNA Gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 2014-2023.

JACOBY, G.A.; N. Chow and K.B. Waites (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 47(2): 559-562.

JAIN, N.R; R. Lodha and S.K. Kabra (2001). Upper respiratory tract infections. Indian J. Pediatr. 68: 1135-1138.

JANOIR, C.; E. Varon, M.D. Kitzis and L. Gutmann (2001). New mutation in *parE* in a *pneumococcal* in vitro mutant resistant to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 952-955.

JANOIR, C.; I. Podglajen, M.D. Kitzis, C. Poyart and L. Gutmann (1999). In vitro exchange of fluorquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and *viridans streptococci* and genomic organization of the *parE-parC* region in *Streptococcus mitis*. J. Infect. Dis. 180: 555-558.

JANOIR, C.; V. Zeller, M.D. Kitzis, N.J. Moreau and L. Gutmann (1996). High-level fluorquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2760-2764.

JEDRZEJAS, M.J. (2001). *Pneumococcal* virulence factors: structure and function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 187-207.

JONES, R.N.; H.S. Sader, M.G. Stilwell and T.R Fritsche (2007). Garenoxacin activity against isolates form patients hospitalized with community-acquired pneumonia and multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis. May;58(1):1-7.

JONES, R.N. and D.J. Biedenbach (2003). Comparative activity of garenoxacin (BMS 284756), a novel desfluoroquinolone, tested against 8,331 isolates from community-acquired respiratory tract infections: North American results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2001). Diagn Microbiol Infect Dis. 45(4): 273-278.

JONES, M.E.; D.F. Sahm, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Köhrer and F.J. Schmitz (2000). The prevalence of *gyrA* , *gyrB*, *parC* and *parE* mutations in clinical isolates of *S. pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluorquinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiartory season. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 462-466.

JONES, R.N.; K.N. Kehrberg, M.E. Erwin, S.C. Anderson and the Fluorquinolone Resistance Surveillance Group (1994). Prevalence of important pathogens and antimicrobial

activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 19: 203-215.

JORGENSEN, J.H.; L.M. Weigel, M.J. Ferraro, J.M. Swenson and F.C. Tenover (1999). Activities of newer fluorquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* loci. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 329-334.

JUMBE, N.L.; A. Louie, M.H. Miller, W. Liu, M.R. Deziel, V.H. Tam, R. Bachhawat and G.L. Drusano (2006). Quinolone efflux pumps play a central role in the emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 50(1): 310-3177.

.

KAATZ, G.W. and S.M. Seo (1997). Mechanisms of fluorquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 41 (12): 2733-2737.

KAATZ, G.W. and S.M. Seo (1995). Inducible *norA*-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2650-2655.

KAATZ, G.W.; S.M. Seo and C.A. Ruble (1993). Efflux-mediated fluorquinolone resistance in *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1086-1094.

KAMPRANIS, S.C. and A. Maxwell (1998). The DNA Gyrase quinolone complex, ATP hydrolysis and the mechanisms of DNA cleavage. J. Biol. Chem.173: 22615-22626.

KANEKO, A.; L. Sasaki, M. Shimadzu, A. Kanamaya, T. Saiki and I. Kobayashi (2000). Comparison of *gyrA* and *parC* mutations and resistance levels among fluorquinolone-resistant isolates and laboratory-derived mutants of oral *streptococci*. J. Antimicro. Chemother. 45: 771-775.

KANEMATSU, E.; T. Deguchi, M. Yasuda, T. Kawamura, Y. Nishino and Y. Kawada (1998). Alterations in the *gyrA* subunit of DNA Gyrase and the *parC* subunit of DNA topoi-

somerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42 (2): 433-435.

KASTNER, M.; U. Rahm, I. Baumann-Wilschke, A. Bello and R. Stahlmann (2004). Concentrations of the des-F(6)-quinolone garenoxacin in plasma and joint cartilage of immature rats. Arch. Toxicol. 78(2): 61-67.

KATO, J.; Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga and H. Suzuki (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell 63 (2): 393-404.

KAYSER, F.H.; K.A. Bienz, J. Eckert and R.M. Zinkernagel (1997). Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, 9. Auflage.

KHODURSKY, A.B. and N. Cozarelli (1998). The mechanism of inhibiton of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. J. Biol. Chem. 273: 27668-27677.

KHODURSKY, A.B.; E.L. Zechiedrich and N. Cozarelli (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11801-11805.

KIRBY, J.T.; A.H. Mutnick, A.N. Jones, D.J. Biedenbach and M.A. Pfaller (2002). Geographic variations in garenoxacin (BMS284756) activity tested against pathogens associated with skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programm (2000). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43(4): 303-9.

KORTEN, V.; W.M. Huang and B.E. Murray (1994). Analysis by PCR and direct DNA sequenzing of *gyrA* mutations associated with fluorquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38 (9): 2091-2094.

KRISHNA, G.; D. Gajjar, S. Swan, T. Marbury, D.M. Grasela and Z. Wang (2007). Garenoxacin pharmacokinetics in subjects with renal impairment. Curr Med Res Opin. 2007 Mar;23(3):649-57.

KRISHNA, G.; R. Noveck, R. Vargas, . Grasela and Z. Wang (2007). Nasogastric administration of garenoxacin as crushed tablets with and without concomitant enteral feeding in healthy subjects. Drugs R D. 2007;8(1):43-50.

KUMUGAI, Y.; J.I. Kato, K. Hoshino, T. Akasaka, K. Sato and H. Ikeda (1996). Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 40 (3): 710-714.

KRISHNA, G.; M.H. Gotfried, K. Rolston and Z. Wang (2007). Penetration of garenoxacin into lung tissues and bone in subjects undergoing lung biopsy or resection. Curr. Med. Res. Opin. August 23(8): 1841 -1847.

LAWRENCE, L.E.; M. Frosco, B. Ryan, S. Chaniewski, H. Yang, D.C. Hooper and J.F. Barrett (2002). Bactericidal activities of BMS-284756, a novel Des-F(6)-quinolone, against *Staphylococcus aureus* strains with topoisomerase mutations. Antimicrob Agents Chemother. 46 (1): 191-195.

LAWRENCE, L.E.; P. Wu, L. Fan, K.E. Gouveia, A. Card, M.Casperson, K. Denbleyker and J.F. Barrett (2001). The inhibition and selectivity of bacterial topoisomerases by BMS-284756 and its analogues. J. Antimicrob. Chemother 49: 195-201.

LESHER,G.Y.; E.J. Froelich, M.D. Gruett, J.H. Bailey and R.P. Brundage (1962). 1,8-naphthyridine derivates, a new class of chemotherapy agents. J. Med. Chem. 5: 1063-1065.

LISTER, P.D. (2003). Impact of AUC/MIC ratios on the pharmacodynamics of the des-F(6) quinolone garenoxacin (BMS-284756) is similar to other fluoroquinolones. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 199-202.

LOPEZ SISNIEGA, J.; M. Profant, R. Kostrica and H. Waskin (2007). Oral garenoxacin in the treatment of acute bacterial maxillary sinusitis: a Phase II, multicenter, noncomparative, open-label study in adult patients undergoing sinus aspiration. Clin Ther. Aug;29(8): 1632-44.

LOW, D.E.; J. de Azavedo, K. Weiss, T. Mazzulli, M. Kuhn, D. Church, K. Forward, G. Zhanel, A. Simor and A. McGeer (2002). Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000. Antimicrob Agents Chemother. 46 (5): 1295-1301.

LOZA, E.; R. Canton, A. Pascual, F. Tubau, M.I. Morosini, F. Almaraz, E. Perea, R. Martin, R.N. Jones and F. Baquero (2003). Comparative in vitro activity of garenoxacin (BMS-284756). Sentry program, Spain (1999-2000) Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21 (8): 404-409.

LU, T.; X. Zhao, X. Li, A. Drlica-Wagner, J.Y. Wang, J. Domagala and K. Drlica (2001). Enhancement of fluorquinolone 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. 45: 2703-2709.

LU, T.; X. Zhao and K. Drlica (1999). Gatifloxacin activity against quinolone-resistant Gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy-group. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2969-2974.

LYON, B.R. and R.A. Skurray (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol. Rev. 51: 88-134.

MALAY, S.; P.M. Roblin, T. Reznik, A. Kutlin and M.R. Hammerschlag (2002). In vitro activities of BMS-284756 against *Chlamydia trachomatis* and recent clinical isolates of *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2): 517-518.

MAMMERI, H.; M. Van De Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez and P. Nordmann (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (1): 71-76.

MARCHESE, A.; E.A. Debbia and G.C. Schito (2000). Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander project. J. Antimicrob. Chemother. 46, Suppl T1: 11-15.

MARIANS, K. and H. Hiasa (1997). Mechanisms for quinolone action: a drug-induced structural pertubation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. J. B iol.Chem. 272: 9401-9409.

MARKHAM, P. (1999). Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 988-989.

MARKHAM, P. and A.A. Neyfakh (1996). Inhibition of the multidrug transporter *NorA* prevents emergence of Norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2673-2674.

MARTINEZ, J.L.; A. Alonsa, J.M. Gomez-Gomez and F. Baquero (1998). Quinolone resistance by mutations in chromosomal Gyrase genes. Just the tip of the iceberg? J. Antimicrob. Chemother. 42: 683-688.

MARTONE, W.J.; W.R. Jarvis, D.H. Culver and R.W. Haley (1992). Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. Hosp. Infect. 3: 577-596.

MAXWELL, A. and M. Gellert (1986). Mechanistic aspects of DNA topoisomerase. Adv. Protein Chem. 38: 69-107.

McCORMICK, J.K.; J.M. Yarwood and P.M. Schlievert (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu. Rev. Microbiol. 55: 77-104.

MICHOT, J.M.; C. Seral, F. Van Bambeke, M.P. Mingeot-Leclercq and P.M. Tulkens (2005). Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in J774 macrophages. Antimicrob. Agents Chemother. 49(6): 2429-37.

MICHOT, J.M.; C. Seral, F. Van Bambeke, M.P. Mingeot-Leclercq and P.M. Tulkens (2004). Ciprofloxacin is subject to efflux from J774 macrophages through a multidrug resistance-related protein-like transporter. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2673-2682.

MILATOVIC, D.; F.-J. Schmitz, S. Brisse, J. Verhoef and A.C. Fluit (2000). In vitro activities of sitafloxacin ((DU6859a) and six other fluorquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1102-1107.

MITCHELL, T.J. (2000). Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae.* Res. Microbiol. 151: 413-419.

MOROSINI, M.I.; E. Loza, R. del Campo, F. Almaraz, F. Baquero and R. Canton (2003). Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Spain: activities of garenoxacin against clinical isolates including strains with altered topoisomerases. Antimicrob Agents Chemother. 47 (8):2692-2695.

MULLIGAN, M.E.; B.S. Murray, B.S. Ribner, H.C. Standiford, J.F. John, J.A. Korvick, C.A. Kaufmann and V.L. Yu (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications of prevention and management. Am. J. Med. 43: 313-328.

MUNOZ, R. and A.G. de la Campa (1996). *ParC* subunit of DNA topoisomerase IV of *S. pneumoniae* is a primary target of fluorquinolones and cooperates with DNA Gyrase A subunit in forming resistance phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2252-22577.

MUNOZ-BELLIDO, J.L.; M. Alonzo Manzanares, J.A. Martinez Andres, M.N. Gutierrez Zufiaurre, G. Yague Guirao, M. Segovia Hernandez and J.A. Garcia-Rodriguez (1999). Efflux-pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild-type *gyrA, gyrB, grlA* and *norA*. Antimicrob. Agents. Chemother. 43: 354-356.

NAGAI, A.; M. Miyazaki, T. Morita, S. Furubo, K. Kizawa, H. Fukumoto, T. Sanzen, H. Hayakawa and Y. Kawamura (2002). Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs. J.Toxicol. Sci. 27 (3):219-228.

NAGAI, K.; T.A. Davies, B.E. Dewasse, M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum (2001). Single- and multistep-resistance selection study of gemifloxacin compared with trovafloxacin, ciprofloxacin, gatifloxain and moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 48: 365-374.

NAKAMURA, T. and M. Komatsu (2005). Susceptibility of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to various antibacterial agents. Jpn. J. Antibiot. 58 (1):1-10.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARS (1998). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eight informational supplement. NCLL document M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. P.A. Wayne.

NEYFAKH, A.A.; C.M. Borsch and G.W. Kaatz (1993). Fluorquinolone resistance protein *NorA* of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 128-129.

NG, E.Y.; M. Trucksis and D.C. Hooper (1996). 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 fluorquinolones in *S. aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1881-1888.

NICOLAU, D.P.; H.M. Mattoes, M. Banevicius, D. Xuan and C.H. Nightingale (2003). Pharmacodynamics of a novel des-F(6)-quinolone, BMS-284756, against *Streptococcus pneumoniae* in the thigh infection model. Antimicrob Agents Chemother. 47 (5):1630-1635.

NORDMANN, P. and L. Poirel (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J. Antimicrob. Chemother. 56 (3): 463-469.

OBARO, S. and R. Adegbola (2002). The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. J. Med. Microbiol. 51: 98-104.

PAN, X.S.; G. Yague and L.M. Fisher (2001). Quinolone resistance mutations in *Streptococcus pneumoniae gyrA* and *parC* proteins: mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels and phenotypes of wild-type and mutant proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3140-3147.

PAN, X.S. and L.M. Fisher (1999). *Streptococcus pneumoniae* DNA Gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification and differential inhibition by fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1129-1136.

PAN, X.S. and L.M. Fisher (1998). DNA Gyrase and topoisomerase IV are dual targets of cinofloxacin action in *S. pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother 42: 2810-2816.

PAN, X.S. and L.M. Fisher (1997). Targeting of DNA Gyrase by Sparfloxacin: selective targeting of Gyrase or topoisomerase IV by quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 471-474.

PAN, X.S.; J. Ambler, S. Methar and L.M. Fisher (1996). Involvement of topoisomerase IV and DNA Gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2321-2326.

PAN, X.S. and L.M. Fisher (1996). Cloning and characetrization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluorquinolone resistance. J. Bacteriol. 178: 4060-4069.

PANKUCH, G.A.; M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum (2003). Postantibiotic effects of garenoxacin (BMS-284756) against 12 gram-positive or -negative organisms. Antimicrob. Agents Chemother. 47 (3):1140-1142.

PANKUCH, G.A.; K. Nagai, T. A. Davies, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum (2002). Antipneumococcal activity of BMS 284756 compared to those of six other agents. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:** 251-254.

PANKUCH, G.A.; S.A. Juenmann, T.A. Davies, M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum (1998). In vitro selection of resistance to four β-lactams and azithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2914-2918.

PATERSON, D.L.; F. Rossi, F. Baquero, P.R. Hsueh, G.L. Woods, V. Satishchandran, T.A. Snyder, C.M. Harvey, H. Teppler, M.J. Dinubile and J.W. Chow (2005). In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). J. Antimicrob. Chemother. 55(6): 965-973.

PENA, C.; J.M. Albareda, R. Pallares, M. Pujol, F. Tubau and J. Ariza (1995). Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 520-524.

PENG, H. and K. Marians (1995). The interaction of *Escherichia coli* topoisosomerase IV with DNA. J. Biol. Chem. 279: 25286-25290.

PEREYRE, S.; H. Renaudin, C. Bebear and C.M. Bebear (2004). In vitro activities of the newer quinolones garenoxacin, gatifloxacin, and gemifloxacin against human *Mycoplasma*s. Antimicrob. Agents Chemother. 48(6): 2081-2084.

PERICHON, B.J. ; J. Tancovic and P. Courvalin (1997). Characterization of a mutation in the *parE* gene that fluorquinolone resistance in *S. pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1166-1167.

PESTOVA, E.; R. Beyer, N.P. Cianciott, G.A. Noskin and L.R. Peterson (1999). Contribution of topoisomerase IV and DNA Gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluorquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2000-2004.

PETERSEN, U. (2001). Von der Nalixidinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation. Pharmazie in unserer Zeit 5: 376-380.

PHILIPS, I.; E. Culebras, F. Moreno and F. Baquero (1987): Induction of the SOS-response by new 4-quinolones. J. Antimicrob. Chemother. 20a: 631-638.

POIREL, L.; M. Van De Loo, H. Mammeri and P. Nordmann (2005). Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. Antimicrob Agents Chemother. 49 (7): 3091-3094.

REECE, R. and A. Maxwell (1991). DNA Gyrase: structure and function. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 335-375.

REINERT, R.R.; R. Lutticken, S. Reinert, A. Al-Lahham and S. Lemmen (2004). Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates of outpatients in Germany, 1999-2000. Chemotherapy. 50 (4): 184-189.

ROBERT, J.; E. Cambau, A. Grenet, D. Trystram, Y. Pean, M.H. Fievet and V. Jarlier (2001). Trends in quinolone susceptibility in *Enterobacteriaceae* among inpatiens of a large university hospital 1992-1998. Clin. Microbiol. Infect. 7 (10): 553-561.

RODRIGUEZ, J.C.; F. Llineares and G. Royo (2001). In vitro development of resistance to three quinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Chemotherapy 47: 39-42.

RODRIGUEZ-CERRATO, V.; C.C. McCoig, J. Saavedra, T. Barton, I.C. Michelow, R.D. Hardy, K. Bowlware, J. Iglehart, K. Katz and G.H. Jr. McCracken (2003). Garenoxacin (BMS-284756) and moxifloxacin in experimental meningitis caused by vancomycin-tolerant pneumococci. Antimicrob. Agents Chemother. 47(1): 211-215.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M. (2005). Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. Enferm .Infecc. Microbiol. Clin. 23(1): 25-31.

ROSIN H. and D. Henschler (1996). Antibiotika und Chemotherapeutika. In: FORTH, W.; D. Henschler, W. Rummel and K. Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

ROTH, H.J. and H. Fenner. Arzneistoffe. Thieme Verlag, 2. Auflage

ROYCHOUDHURY, S. and B. Ledoussal (2002). Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2(1): 51-65.

ROYCHOUDHURY, S.; T.L. Twinem, K.M. Makin, E.J. McIntosh, B. Ledoussal and C.E. Catrenich (2001). Activity of non-fluorinated quinolones (NFQs) against quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 48: 29-36.

ROYCHOUDHURY, S.; T.L. Twinem, K.M. Makin, M.A. Nienaber, B. Ledoussal and C.E. Cartrenich (2001). *Staphylococcus aureus* mutants isolated via exposure to nonfluorinated quinolones: detection of known in unique mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3422-4326.

RUIZ, J.; J.M. Sierra, M.T. De Anta, J. Vila (2001). Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained in vitro. Int. J. Antimicrob. Agents 18: 107-112.

SACHS, L. (1992). Angewandte Statistik. Springer, 7. Auflage: 649-651.

SADER, H.S; T.R. Fritsche and R.N. Jones (2007). In vitro activity of garenoxacin tested against a worldwide collection of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* strains (1999-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. May;58(1):27-32.

SCHABERG, D.R.; W.I. Dillon, M.S. Terpenning, K.A. Robinson, S.F. Bradley and C.A. Kauffman (1992). Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2533-2535.

SCHEDLETZKY, H.; B.Wiedemann and P. Heisig (1999). The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob.Chemother. 43 (Suppl. B): 31-37.

SCHMITZ, F.-J.; M. Boos, S. Mayer, H. Jagusch and A. C. Fluit (2002). Increased in vitro activity of the novel des-fluoro(6) quinolone BMS-284756 against genetically defined clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 49**:** 283-287.

SCHMITZ, F.- J.; M. Boos, S. Mayer, K. Kohrer, S. Scheuring and A. C. Fluit (2002). In vitro activities of novel des-fluoro(6) quinolone BMS-284756 against mutants of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus* selected with different quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:** 934-935.

SCHMITZ, F.-.J.; M. Boos, H. Jagusch, S. Mayer, A.C. Fluit and D. Hafner (2001). Induction of in-vitro resistance to BMS-284756 by *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 48: 588-590.

SCHMITZ, F.-J.; A. Fischer, M. Boos, S. Mayer, D. Milatovic and A.C. Fluit (2001). Quinolne-resistance mechanisms and in-vitro susceptibility pattern among European isolates of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J. Clin. Microb. Inf. Dis. 20: 219-222.

SCHMITZ, F.-J.; K. Köhrer, S. Scheuring, J. Verhoef, A.C. Fluit, H.P. Heinz *et al.* (1999). The stability of *grlA, grlB, gyrA, gyrB* and *norA* mutations and MIC values of five fluorquinolones in three different clonal populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical and Microbiological Infection 5: 287-290.

SCHMITZ, F.-J.; J. Verhoef, A.C. Fluit (1999). Comparative activities of six different fluorquinolones against 9.862 clinical bacterial isolates from 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance program. Int. J. Antimicrob. Agents 12: 311-317.

SCHMITZ, F.-J.; B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Lückefahr, M. Klootwijk *et al.* (1998). Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin MICs and mutations in *grlA grlB, gyrA*, and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrob. Chemother. 41: 481-484.

SCHMITZ, F.-J.; A.C. Fluit, M. Lückefahr, B. Engler, B. Hofmann, J. Verhoef *et al.* (1998). The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, Sparfloxacin, and Moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial. Chemother. 42: 807-810.

SCHMITZ, F.-J.; M.E. Jones, B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Luckefahr, A.C. Fluit, J. Verhoef, U. Hadding, H.P. Heinz and K. Köhrer (1998). Characterization of *grlA, grlB, gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. Antimicrob. Agents Chemother, 42: 1249-1252.

SCHMITZ, F.-J.; B. Hertel, B. Hofmann, S. Scheuring, J. Verhoef, A.C. Fluit *et al.* (1998). Correlation of norfloxacin MIC-values with mutations within the coding and promoter region of the *norA* gene in 42 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 42: 561-563.

SCHMITZ, F.-J.; E. Lindenlauf, B.Hofmann, A.C. Fluit, J. Verhoef, H.P. Heinz and M.E. Jones (1998). The prevalence of low- and high-level mupirocin resistance in staphylococci from 19 European hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 42 (4): 489-495.

SCHMITZ, F.-J. (1998): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – detection, typing, epidemiology, virulence and therapy. Proefschrift Universiteit Utrecht.

SCHMITZ, F.-J. and M.E. Jones (1997). Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? Int.J.Antimicrob. Agents 9: 1-19.

SCHMITZ, F.-J.; K.E. Veldkamp, K.P.M. Van Kessel, J. Verhoef and J.A.G.Van Strijp (1997). Delta-Toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. J. Infect. Dis. 176: 1531-1537.

SCHMITZ, F.-J.; S. Kuchta and H.P. Heinz (1997). Evaluation of the *MicroScan Walk-Away 96 System*. Clin. Lab. 43: 39-51.

SCHMITZ, F.-J. and H.P. Heinz (1996). Methicillin-resistente Staphylococcus aueus-Stämme, Vorkommen und Detektionsverfahren. MTA 11: 774-780.

SERAL, C.; M. Barcia-Macay, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens and F. Van Bambeke (2005). Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages. J. Antimicrob. Chemother. 55 (4): 511-517.

SHAKIBAEI, M. and R. Stahlmann (2003). Ultrastructural changes induced by the des-F(6)-quinolone garenoxacin (BMS-284756) and two fluoroquinolones in Achilles tendon from immature rats. Arch. Toxicol. 77 (9): 521-526.

SHEN, L.L.; L.A. Mitcher, P.N. Sharma, T.J. O'Donnel, D.W. Chen, C.S. Cooper, T. Rosen and A.G. Pernet (1989). Mechanism of inhibition of DNA Gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. Biochemistry 28: 3886-3894.

SHIMIZU, M. (1988). Progress and future prospect of pyridonecarboxylic acids. J. Japan. Assoc. Infect. Dis. 62: 192-201.

SIERRA, J.M.; F. Marco, J. Ruiz, M.T. Jimenez de Anta and J. Vila (2002). Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 8(12): 781-790.

SIMON, C. and W. Stille (2000). Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis**.** Schattauer Verlag, 10. Auflage.

SMITH, R.P.; A.L. Baltch, W.J. Ritz, A.N. Carpenter, T.A. Halse and L.H. Bopp (2004). In vitro activities of garenoxacin and levofloxacin against *Chlamydia pneumoniae* are not affected by presence of *Mycoplasma* DNA. Antimicrob.Agents Chemother. 48 (6): 2081-2084.

TAKAHASHI, H.; I. Hayakawa and T. Hakimoto (2003). The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents. Yakushigaku Zasshi 38 (2): 161-179.

TAKAHATA, M.; M. Shimakura, R. Hori, K. Kizawa, Y. Todo, S. Minari, Y. Watanabe, H. Narita (2001). In vitro and in vivo efficacies of T-3811ME (BMS-284756) against *Mycoplasma* pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 312-315.

TAKAHATA, M.; J. Mitsuyama, Y. Yamashiro, M. Yonezawa, H. Araki, Y. Todo, S. Minari, Y. Watanabe and H. Narita (1999). In vitro and in vivo antimcrobial activities of T-3811ME, a novel des F(6)-quinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1077-1084.

TAKAHATA, M.; M. Yonezawa, S. Kurose, N. Futakucki, N. Matsubara, Y. Watanabe and H. Narita (1996). Mutations in the *gyrA* and *grlA* genes of quinolone-resistant clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 38: 543-546.

TAKENOUCHI, T.; C. Ishii, M. Sugawara, Y. Tokue and S. Ohya (1995). Incidence of various *gyrA* mutations in 451 *Staphylococcus aureus* strains isplated in Japan and their susceptibilities to 10 fluorquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1414-1418.

TAM, V.H.; A. Louie, M.R. Deziel, W. Liu, R. Leary and G.L. Drusano (2005). Bacterial-population responses to drug-selective pressure: examination of garenoxacin's effect on *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Dis. 2005 Aug 1;192(3): 420-428.

TANKOVIC, J.; F. Mahjoubi, P. Courvalin, J. Duval and R. Leclerco (1996). Development of fluorqinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA Gyrase *gyrA* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 40 (11): 2558-2561.

TANKOVIC, J.; B. Perichon, J. Duval and P. Courvalin (1996). Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluorquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2502-2510.

THORNSBERRY, C.; P. Ogilvie, J. Kahn and Y. Mauriz (1997). Surveillance of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* and *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1996-1997 respiratory season. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 29: 249-257.

TOMASZ, A. (1997). Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 24, Suppl. 1: 85-88.

TRAN, J.H.; G.A. Jacoby and D.C. Hooper (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (7): 3050-3052.

TUOMANEN, E. (1999). Molecular and cellular biology of *pneumococcal* infections. Curr. Opin. Microbiol. 2: 35-39.

TURNIDGE, J. (1994). Epidemiology of quinolones resistance: Southern hemisphere. Drugs 49 (2).

VAN WART, S.; L. Phillips, E.A. Ludwig, R. Russo, D.A. Gajjar, A. Bello, P.G. Ambrose, C. Costanzo, T.H. Grasela, R. Echols and D.M. Grasela (2004). Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of garenoxacin in patients with community-acquired respiratory tract infections. Antimicrob. Agents. Chemother. 48 (12): 4766-4777.

VARON, E.; C. Janoir, M.D. Kitzis and L. Gutmann (1999). *ParC* and *gyrA* may be interchangeable initial targets of some fluorquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 302-306.

WANG, Z.; D.M Grasela and M. Krishna (2007). Retrospective analysis of electrocardiographic changes after administration of oral or intravenous garenoxacin in five phase I, placebo-controlled studies in healthy volunteers. Clin Ther. Jun;29(6):1098-106.

WANG,G.; J.F. Hindler, K.W. Ward and D.A. Bruckner (2006). Increased Vancomycin minimal inhibitory concentrations in *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a five-year period. J. Clin. Microbiol. Sep. 6.

WATSON, D.A.; D.M. Musher and J. Verhoef (1995). *Pneumococcal* virulence factors and host immune responses to them. Eur. J. Cli. Microbiol. Infect. Dis. 14: 479-490.

WEBER, S.G.; H.S. Gold, D.C. Hooper, A.W. Karchmer and Y. Carmeli (2003). Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. Emerg. Infect. Dis.9 (11): 1415-1422.

WEIGEL, L.M.; C.D. Steward and F.C. Tenover (1998). *GyrA* mutations associated with fluorquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2661-2667.

WELLER, T. M.; J.M. Andrews, G. Jevons and R. Wise (2002). The in vitro activity of BMS-284756, a new des-fluorinated quinolone. J. Antimicrob. Chemother. 49**:**177-184.

WIEDEMANN, B. And P. Heisig (1999). Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin). Chemotherapie Journal 3: 99-107.

WILLMOTT, C.J. and A. Maxwell (1993). A single point mutation in the DNA Gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the Gyrase-DNA-complex. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 126-127.

WITTE, W. (1998). Fluorchinolone mit verbesserter Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien-vergleichende Erörterung der in-vitro-Daten. Mikrobiol. 8: 22-30.

WOLFSON, J. S. and D.C. Hooper (1985). The Fluorquinolones. Structures, Mechanisms of Action and Resistance and Spectra of Activity in Vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 581-586.

YAMAGASHI, J.I.; T. Kojima, Y. Oyamada, K. Fujimoto, H. Hattori, S. Nakamura and M. Inoue (1996). Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1157-1163.

YAMAGUCHI, K.; A. Ohno, F. Kashitani, M. Iwata, Y. Shimizu, S. Sato, I. Matsumoto, M. Itoh, T. Funato, Y. Tsujio, M. Nagasawa, M. Tachibana, H. Kanno, K. Matsuda, J. Okada, H. Takaya, T. Nakamura, J. Igari, K. Sugimoto, T. Oguri, S. Toyoshima, M. Okada, T. Nakai, M. Kuwabara, Z. Nagasawa, *et al.* (1999). In vitro activities of 23 antimicrobial agents against 4,993 gram-positive and gram-negative bacterial strains isolated from multicenter of Japan during 1994-in vitro susceptibility surveillance. Levofloxacin-Surveillance Group. Jpn. J. Antibiot. 52**:** 75-92.

YAMAZAKI, T.; T. Sasaki and M Takahata (2007). Activity of Garenoxacin against Macrolide-Susceptible and –Resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. June 51(6): 2278-2279.

YAN, S.S.; M.L. Fox, A.M. Holland, F. Stock, V.J. Gill and D.P. Fedorko (2000). Resistance to multiple fluorquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification for *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. Antimicro. Agents Chemother. 44: 3196-3198.

YANG, S.; S.R. Clayton and E.L. Zechiedrich (2003). Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 51 (3): 545-556.

YOSHIDA, H.; M. Bogaki, M. Nakamura and S. Nakamura (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA Gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 34 (6): 1271-1272.

YU, W.L.; R.N. Jones, R.J. Hollis, S.A. Messer, D.J. Biedenbach, L.M. Deshpande and M.A. Pfaller (2002). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing, fluoroquinolone-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. J. Clin. Microbiol. 40 (12): 4666-4669.

ZECHIEDRICH, L.; A.B. Khodursky and N. Cozarelli (1997). Topoisomerase IV, not Gyrase decatenates products of sidespecific recombination in *E. coli*. Genes Dev. 11: 2580-2592.

ZELLER, V.; C. Janoir, M.D. Kitzis, L. Gutmann and N.J. Moreau (1997). Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1973-1978.

ZHANEL, G.G.; L. Palatnick, K.A. Nichol, T. Bellyou, D.E. Low and D.J. Hoban (2003). Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. Antimicrob. Agents Chemother. 47 (6): 1867-1874.

ZHANEL, G.G.; S. Fountaine, H. Adam, K. Schurek, M. Mayer, A.M. Noreddin, A.S. Gin, E. Rubinstein and D.J. Hoban (2006). A Review of New Fluoroquinolones : Focus on their Use in Respiratory Tract Infections. Treat Respir Med. 2006;5(6):437-465.

8 Anhang

Danksagung

Ich bedanke mich bei

Herrn Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine freundliche Betreuung, Unterstützung und gute Zusammenarbeit

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Walter Däubener für die Übernahme der Korreferentschaft

Herrn PD Dr. med. Ulrich Germing für die Übernahme der mündlichen Prüfung

Alexandra Selaru für die tatkräftige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und liebenswürdige Art

allen Mitarbeitern der Mikrobiologie und der Virologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, die mir Arbeitsmaterial und Geräte zur Verfügung stellten

den Mitarbeitern der Nährbodenküche für die nette Atmosphäre und tatkräftige Unterstützung

der Arbeitsgruppe Schmitz für das gute Arbeitsklima und die hilfreichen Ratschläge

Christian Schmalen für seine Geduld, Hilfsbereitschaft und Ausdauer

meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner, die meine Arbeit mit Interesse verfolgten und mich stets unterstützten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Stephanie Dömkes
Anschrift:	Ohligser Strasse 110 42781 Haan
Telefon:	02129/6519
Mobil:	0157/73839522
E-Mail:	stephaniedoemkes@web.de
Geburtsdatum:	06.02.1978
Geburtsort:	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Berufliche Tätigkeit

05.2008 – heute	Assistenzärztin in der Dermatologie an der Fachklinik Bad Bentheim, Deutschland
01.2008 – 04.2008	Residency am Concord Repatriation Hospital in Sydney, Australien • Term 1: Infectious Diseases • Term 2: Geriatric Medicine
01.2007 – 01.2008	Internship am Royal Prince Alfred Hospital in Sydney, Australien • Term 1: Geriatric Medicine • Term 2: Colorectal Surgery • Term 3: Emergency Department • Term 4: Upper Gastrointestinal Surgery • Term 5: Nights and Relief (Rheumatology and Immunology)

Promotion

2008	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz **Thema:** Epidemiolgische und molekulargenetische Charakterisierung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und dem neuen Des-F6-Chinolon BMS-284756 bei Staphylococcus aureus, Streptococcus spp. und Enterobacteriaceae

Ausbildung/Weiterbildung

09.2006	Australian Medical Council Structured Clinical Assessment (Mündliche Prüfung für internationale Ärzte in Australien)
11.2005	Australian Medical Council Multiple Choice Examination (Schriftliche Prüfung für internationale Ärzte in Australien)
03.1998 – 11.2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf • 3. Staatsexamen Winter 2004 • 2. Staatsexamen Herbst 2003 • 1. Staatsexamen Frühjahr 2001 • Physikum Frühjahr 2000
10.1997 – 02.1998	Studium der Psychologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
1994 – 1997	Abitur am Dietrich-Bonhoeffer Gymnasium in Hilden

Praktisches Jahr

05.2004 – 09.2004	Dermatologie und Venerologie an der Hautklinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
02.2004 – 05.2004	Chirurgie am Concord Repatriation Hospital in Sydney, Australien
10.2003 – 01.2004	Innere Medizin an der MNR-Klinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie und Abteilung für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie)

Praktika/Nebentätigkeiten

2005-2006	Altenpflegerische Tätigkeit Winston House Nursing Home in Croydon, Australien
1999 – 2001	Krankenpflegerische Tätigkeit St. Josef Krankenhaus Haan
Sommer 1999	Pflegepraktikum St. Josef Krankenhaus Haan

Kenntnisse

Sprachen	Englisch fließend in Wort und Schrift
EDV	Sicherer Umgang mit MS Office und dem Internet

Haan, den 22.12..2008

Epidemiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und dem neuen Des-F6-Chinolon BMS-284756 bei *Staphylococcus aureus, Streptococcus spp.* und *Enterobacteriaceae*

Vorgelegt von

Stephanie Dömkes

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Resistenzepidemiologie und der Resistenzmechanismen von *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae und* einigen *Enterobacteriaceae* in Bezug auf die in-vitro-Aktivität des neuen Des-F6-Chinolons BMS-284756 und dessen Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die klassischen Alterationen in den Zielstrukturen Gyrase und Topoisomerase für verschiedene Bakterienspezies beschrieben und die in vitro Aktivitäten der unterschiedlichen Antibiotika mit den gefundenen Mutationen korreliert. Unabhängig von den genetischen Veränderungen war Clinafloxacin am wirksamsten gegenüber sämtlichen genannten Spezies, außer bei *E. cloacae*. BMS-284756 (BMS), das neue Chinolon, welches keinen Fluor-Liganden an Position 6 trägt, wies hervorragende in-vitro-Aktivitäten selbst bei Isolaten mit Alterationen in *gyrA* und *grlA/parC* auf. Ein Transport von BMS mittels "Multidrug"-Effluxpumpen konnte nicht beobachtet werden, wie Versuche mit dem Effluxpumpen-Inhibitor Reserpin zeigten.

Bei der Analyse der Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit stellte sich heraus, dass gegenüber sämtlichen Chinolonen eine Resistenzentwicklung mit Selektion klinisch resistenter gram-positiver *S. aureus-, S. pneumoniae-* und *S. pyogenes*-Isolaten eintrat. Die Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit verlief gegenüber BMS statistisch signifikant langsamer verglichen mit anderen Chinolonen. Bei gram-negativen Bakterienspezies führte die sequentielle Subkultivierung mit subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen Chinolonen zur Resistenzentwicklung in *E. coli, K. pneumoniae* und *E. cloacae*. Hauptsächlich klassische Mutationen in *parC* und *gyrA* trugen zur Resistenzentwicklung bei den meisten Mutanten bei. BMS zeigt bei gram-positiven Erregern eine sehr gute in-vitro-Aktivität und eine langsame Resistenzentwicklungsgeschwindigkeit, während bei gram-negativen Erregern diese Vorteile nicht so deutlich sind.

Minden, den 15.02.08 Prof. Dr. F.-J. Schmitz