

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der

**Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Pfeffer

---

Molekulare Untersuchung der Makrolid-, Tetrazyklin-, Chinolon- und  
Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Resistenzmechanismen bei  
europäischen *Streptococcus pneumoniae* Isolaten

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Mirella Perdikouli**

2003

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

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

Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. Idel

**Abkürzungsverzeichnis**

***Aminosäuren***

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

***Sonstige***

AN	Arbeitsnummer
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat-Lösung
Bp	Basenpaar(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENARE	European Network for Antimicrobial Resistance and Epidemiology
FQ(s)	Fluorochinolon(e)
Kb	Kilobase(n)
MHK	Minimale Hemmkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

NCCL	National Committee for Clinical Laboratory Standards
P	PCR-Protokoll
PCR	Polymerase chain reaction
R	Resistenz
QRDR	Quinolone resistance determining region
S	Sensibilität
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
spp.	Spezies
TEMED	N,N,N', N'-tetramethylethylenediami

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Inzidenz und Prognose von <i>S. pneumoniae</i> Infektionen	7
1.2	Makrolid- und Lincosamidresistenz	9
1.3	Tetrazyklinresistenz	13
1.4	Chinolonresistenz	14
1.5	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol-Resistenz	18
1.6	$\beta$ -Laktam-Resistenz	20
1.7	Fragestellung	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	<b>Bakterien</b>	<b>22</b>
2.1.1	Streptococcus pneumoniae	22
2.1.1.1	Herkunft der Bakterienstämme	23
2.2	<b>Chemikalien</b>	<b>23</b>
2.2.1	Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen	23
2.2.2	Antibiotika	25
2.2.3	Testblättchen	25
2.2.4	Kits	25
2.3	<b>Primer (Gibco BGL)</b>	<b>26</b>
2.3.1	<i>S. pneumoniae</i> (spezifische Primersequenzen)	26
2.3.1.1	<i>Tag</i> -Primersequenzen	27
2.4	<b>Nährmedien</b>	<b>28</b>
2.5	<b>Apparaturen</b>	<b>28</b>
2.6	<b>Untersuchungsmethoden</b>	<b>28</b>
2.6.1	MicroScan Walk Away 96 System (= DADE)	28
2.6.1.1	Testfelder der Mikrotiterplatten für <i>grampositive</i> Bakterien	29
2.6.2	Agarosegelelektrophorese	30
2.6.3	Messung der optischen Dichte	30
2.6.4	Agardiffusionstest	30
2.6.5	Bakterienkonservierung	31
2.6.6	Sterilisation	31
2.6.7	PCR	32
2.6.8	Aufreinigung	34
2.6.9	Sequenzierreaktion	35
2.6.10	Fällung	36
2.6.11	Sequenzierung	36
2.6.12	MHK-Bestimmung	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1.	<b>Makrolide</b>	<b>39</b>
3.2	<b>Tetrazykline</b>	<b>41</b>
3.3	<b>Chinolone</b>	<b>42</b>
3.4	<b>Trimethoprim/Sulfamethoxazol</b>	<b>44</b>
3.5	<b><math>\beta</math>-Laktame</b>	<b>46</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b><i>Bildanhang</i></b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b><i>Tabellenanhang</i></b> .....	<b>74</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Inzidenz und Prognose von *S. pneumoniae* Infektionen

*Streptococcus pneumoniae* zählt zu den häufigsten Krankheitserregern beim Menschen. Dieser Diplococcus verursacht unter anderem Infekte der oberen und unteren Atemwege (Sinusitis, Pneumonien, Otitis media) sowie Meningitis und Peritonitis. Morphologisches Charakteristikum dieses Keims sind ovale bis lanzettenförmige, unbewegliche Einzelkokken, welche zur Kapselbildung befähigt sind und ihr Wachstumsoptimum bei 37 Grad Celsius haben. Die katalasenegativ und fakultativ anaeroben Kolonien wachsen auf Blutagarplatten. Sie werden nach ihrem Hämolysevermögen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Hämolyse) sowie ihrer Antigenität eines in der Zellwand vorkommenden Kohlenhydrates (*Lancefield*-Antigen) eingeteilt. Die im Bereich der Humanmedizin wichtigsten Arten sind *S. pyogenes* (A-Streptokokken) und *S. pneumoniae*. Häufige Folgekrankheiten bei einer inadäquaten antibiotischen Therapie nach einer Pneumokokkeninfektion sind z.B. die Glomerulonephritis oder das akute rheumatische Fieber. Besonders gefürchtet sind neben den oben erwähnten Erkrankungen die Endokarditiden, die in aller Regel schon mit Kombinationspräparaten aus einem Penicillin und einem Aminoglykosid therapiert werden müssen. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß ca. 40-60% der gesunden Bevölkerung Keimträger von *S. pneumoniae* sind. Prädisponierend für Pneumokokkeninfektionen sind z.B. kardiopulmonale Vorerkrankungen, Komplementdefekte, Milzexstirpation und vorausgegangene Infekte. Schwere Infektionen können mit einer Septikämie einhergehen.

Die Diagnose erfolgt mittels mikroskopischer und kultureller Verfahren. Pneumokokken lassen sich aufgrund ihrer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Optochin (Äthylhydrocuprein) im Test oder durch die Untersuchung der Gallelöslichkeit nachweisen. Antibiotikum der Wahl ist nach wie vor das Benzylpenicillin. Die zunehmende Resistenz der Keime gegenüber Penicillinen führte jedoch dazu, daß man zunehmend auf Alternativen wie z.B. Makrolid-Antibiotika auswich. Alarmierende Zahlen der Pneumokokkenresistenz gegenüber Penicillin sind in der Arbeit von Gay [1] dokumentiert: Von 1979 bis 1987 wurden in einer großen Studie [2] in den USA 0,02% Penicillin-resistente Keime gefunden. Weiterführende Untersuchungen zeigten in den darauf folgenden Jahren beunruhigende Zahlen von mehr als 30% Penicillin-resistenten Pneumokokken [3-5]. Pneumokokkeninfektionen kommen endemisch und zu allen Jahreszeiten vor. In den USA erkrankten jährlich etwa 3.000 Menschen an einer Pneumokokkenmeningitis, bei 50.000 kommt es zu einer Bakteriämie und etwa 7 Millionen erkrankten an einer Otitis media. Weltweit werden jährlich 1.2 Millionen

Todesfälle auf Pneumokokkenerkrankungen zurückgeführt. Die Inzidenz (Tabelle 1) der invasiven Pneumokokkeninfektionen zeigt einen Gipfel in der frühen Kindheit (< 2 Jahren) und bei den über 65-Jährigen. Nach dem fünften Lebensjahr nimmt die Häufigkeit stark ab. Risikofaktoren sind unter anderem Frühgeburtlichkeit, chronische Erkrankungen wie Mukoviszidose, HIV, Sichelzellanämien etc. Für das männliche Geschlecht besteht laut einer schottischen Studie ein erhöhtes Risiko, an einer invasiven Pneumokokkeninfektion zu erkranken und zwar 1,2:1 gegenüber dem weiblichen Geschlecht für die Bakteriämie und 1,5:1 für die Meningitis (ÄRZTE WOCHE, 16. Jg., Nr. 36, 2002).

**Tabelle 1:**

**Inzidenz invasiver Pneumokokkeninfektionen (ÄRZTE WOCHE ,16. Jg., Nr. 36, 2002)**

Alter	pro 100.000
0-5 Monate	73,4
6-11 Monate	227,8
12-23 Monate	184,2
24-35 Monate	64,7
36-47 Monate	26,7
> 5 Jahre	5,7
> 65 Jahre	61

Häufig sind ältere, immungeschwächte Patienten betroffen. Ihnen steht eine Immunisierungsprophylaxe mit gereinigten Kapselpolysacchariden von 23 der am häufigsten vorkommenden Serogruppen und Serovaren zur Verfügung.

In letzter Zeit hat die Resistenz gegenüber Penicillin G sowie gegenüber anderen Antibiotika weltweit deutlich zugenommen. So zeigt sich *S. pneumoniae* bereits jetzt zunehmend resistent gegenüber einer Therapie mit Makroliden, Tetrazyklinen und Chinolonen bzw. Kombinationen dieser Antibiotika. Die zugrunde liegenden genetischen Resistenzmechanismen wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht und weitgehend aufgeklärt [6-28].

Zwischen 1997 und 1999 wurden 1191 Isolate von *S. pneumoniae* im Rahmen der so genannten SENTRY Studie untersucht. Diese Arbeit soll einen Überblick über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und die *in-vitro* Aktivität verschiedener Substanzen bei klinischen Pneumokokken-Isolaten aus den Jahren 1997-1999 geben. Die genannte Studie umfaßte 1191 Isolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des SENTRY

Überwachungsprogramms gesammelt wurden. 18% der Isolate stammten aus positiven Blutkulturen, 72% von ambulant erworbenen und 10% von nosokomial erworbenen Pneumonien. Die Isolate wurden aus Österreich (42), Belgien (76), Frankreich (232), Deutschland (104), Griechenland (16), Italien (72), den Niederlanden (32), Polen (36), Portugal (16), Spanien (286), der Schweiz (90), England (38), Türkei (2) und Israel (47) gesammelt und die MHK-Werte verschiedener Antibiotika nach NCCLS [29] Kriterien ermittelt. Bei den resistenten Isolaten wurden die klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen molekular-epidemiologisch untersucht. Im Folgenden werden zunächst der grundsätzliche Resistenzmechanismus, die Resistenzentwicklung und schließlich die *in-vitro* Aktivität der einzelnen Substanzen dargestellt.

### 1.2 Makrolid- und Lincosamidresistenz

Makrolide sind Produkte verschiedener Stämme von *Streptomyces erythreus*. Als Leitsubstanz gilt Erythromycin, welches oral verfügbar und gut verträglich ist. Makrolide entfalten ihre bakteriostatische Wirkung, indem sie an Proteine der 50s-Untereinheit von Ribosomen binden, was die Kettenverlängerung bei der Synthese bakterieller Proteine verhindert. Das Wirkspektrum von Erythromycin umfasst vor allem grampositive Erreger, insbesondere Streptokokken. Gramnegative Erreger, Anaerobier und sogenannte atypische Mikroorganismen wie Mykoplasmen, Chlamydien und Legionellen werden mit Erythromycin weniger gut erfasst. Die in den letzten zehn Jahren halbsynthetisch hergestellten Makrolide Roxithromycin (Rulid®), Clarithromycin (Klacid®) und Azithromycin (Zithromax®) hatten zum Ziel, eine im Vergleich zum Erythromycin höhere Säurestabilität und damit geringere Variabilität der gastrointestinalen Resorption zu erreichen. Eine längere Halbwertszeit, ein erweitertes antimikrobielles Spektrum und weniger gastrointestinale Nebenwirkungen waren ebenfalls erwünscht. Aufgrund der zunehmenden Makrolidresistenz hat man in den letzten Jahren nach Alternativen gesucht. Im vergangenen Jahr kamen gleich zwei Vertreter neuer Antibiotikaklassen auf den deutschen Markt. Zum einen das Telithromycin, einzuordnen in die sich aus den Makroliden heraus entwickelte Gruppe der Ketolide. Zum anderen das Linezolid, das einer strukturell ganz neuen Gruppe mit neuem Wirkmechanismus, den Oxazolidinonen, angehört. Betrachtet man allerdings die Historie und die Entwicklung der Antibiotika insgesamt, so wird man feststellen, daß in den letzten dreißig Jahren kaum neue Antibiotika entwickelt wurden (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Historie der Antibiotika-Entwicklung**

<b>Entwicklung</b>	<b>Stoffgruppe</b>
<b>1936</b>	Sulfonamide
<b>1940</b>	$\beta$ -Laktame
<b>1949</b>	Tetrazykline/Chloramphenicol
<b>1950</b>	Aminoglykoside
<b>1952</b>	Makrolide
<b>1958</b>	Erythromycin/Glykopeptide
<b>1962</b>	Streptogramine/Chinolone
<b>1985</b>	Fluor-Chinolone
<b>1999</b>	Oxazolidinone
<b>2000</b>	Ketolide

Die breite und unkontrollierte Anwendung von Makroliden hat in einigen Ländern zu Resistenzproblemen geführt. So beträgt beispielsweise die Empfindlichkeit von Pneumokokken gegen Clarithromycin und Erythromycin in Ländern wie Frankreich, Spanien, China und Japan zum Teil nur noch 60% und weniger. [30]. In Finnland hat die Resistenz von hämolysierenden Streptokokken gegenüber Erythromycin innerhalb von 3 Jahren (1988-1990) von 4 auf 24% zugenommen [31]. In Atlanta fand man 1994 16% Erythromycin-resistente Pneumokokken, 1999 bereits mehr als 31% [1]. Grundsätzlich eignen sich alle neueren Makrolide zur Behandlung ambulant erworbener Pneumonien. Vor einem unbedachten Einsatz muß jedoch in Anbetracht der nachweisbar zunehmenden Resistenzentwicklung bei den Pneumokokken gewarnt werden.

Erythromycin ist gekennzeichnet durch seine Instabilität gegen Säure. Die Magensäure katalysiert in einem ersten Schritt die intramolekulare Hemiacetalisierung der Ketogruppe mit der Hydroxylgruppe in der "nördlichen" Hemisphäre des Moleküls sowie weitere intramolekulare Ringschlußreaktionen. In den Ketoliden Telithromycin und ABT 773, den „Nachfolgern“ der Makrolide, ist die Alkoholgruppe an C-6 verethert, was die erwähnte Reaktionsfolge unterdrückt. Von entscheidender Bedeutung für eine Resistenzinduktion ist hier der Austausch des Zuckers Cladinose an C-3 gegen eine Ketogruppe, die den veränderten Makroliden ihren neuen Namen gegeben hat. Zusammen mit dem cyclischen Carbamat sorgt diese Ketogruppe auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls für einen veränderten Wirkmechanismus und somit eine deutlich höhere antibiotische Aktivität der Ketolide im Vergleich zu den Makroliden [32]. Makrolide und Ketolide greifen in die Proteinbiosynthese ein [33]. Um die Proteinbiosynthese in Gang zu setzen, müssen sich die 30S- und 50S-Untereinheiten der Ribosomen zusammenlagern. Dieser Prozess der Zusammenlagerung der Vorläufer der 50S-Untereinheiten wird sowohl von Makroliden als auch von Ketoliden

gestört. Ist ein Komplex der ribosomalen 30S- und 50S-Untereinheit mit der mRNA gebildet, so bindet die transfer-RNA an die mRNA und sorgt mit Hilfe einer Peptidyltransferase für den Aufbau des Peptidfadens. Dieser wird durch einen Translationskanal durch die ribosomale RNA nach außen transportiert. Genau in diesen Kanal lagern sich die Makrolide und Ketolide ein und verhindern so die Translokation.

Hierbei zeigen sich graduelle Unterschiede zwischen Makroliden und Ketoliden. Während die Hauptbindungsstelle für die Makrolide das Adenin 2058 in der Domäne V der 23S rRNA darstellt (übrigens findet an dieser Stelle auch die Methylierung bei der Resistenzentwicklung statt), binden die Ketolide aufgrund der zusätzlichen Carbamatfunktion zusätzlich an Adenin 752 in der Domäne II der 23S rRNA. Es kommt so zu einer 10-fach festeren Bindung an die ribosomale RNA als z.B. bei Clarithromycin. Diese stärkere Bindung an die rRNA erschwert zusätzlich die Methylierung des Adeninrestes A2058, was die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzresistenz zu den MLS-Antibiotika deutlich verringert. Trotz allem wurde auf der letzten International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) im Dezember 2001 in Chicago schon von ersten Ketolid-resistenten Streptokokken berichtet (Tait-Kamradt, A.G., et al., High-Level Resistent-Streptococci, ICAAC 2001, Poster 1813) und die vorgeschlagene First-Line-Therapie mit Ketoliden wegen der Gefahr bereits beobachteter Resistenzentwicklungen kontrovers diskutiert.

Nicht sinnvoll ist im Allgemeinen der primäre Einsatz von neueren Makroliden bei Pharyngitis, Sinusitis, Otitis media und Bronchitis. Bei diesen Erkrankungen kommen Makrolide lediglich als Alternative in Frage, wenn z.B. eine Penicillinallergie besteht.

Pneumokokken zeigen primär zwei unterschiedliche Mechanismen der Makrolidresistenz. Der erste Mechanismus basiert auf dem *mefE* Gen, welches für die Effluxpumpe der „Major facilitator-Gruppe“ codiert. Die transmembranalen Segmente der Effluxpumpe beziehen ihre Energie aus dem H<sup>+</sup>-Gradienten der Membran. Die Pneumokokken zeigen bei diesem Mechanismus eine reine Makrolidresistenz (M-Phänotyp) in Form eines gesteigerten Effluxes von Makroliden [18, 22, 27, 34-41].

Das *ermB* Gen, welches eine 23S rRNA Methylase codiert, spielt beim zweiten Mechanismus der Resistenzentwicklung eine Rolle. Das Anheften der Makrolide wird in der Form verhindert, daß die Methylase zwei Methylgruppen auf den Adeninrest an Position A2058 der 23S rRNA überträgt und damit nicht nur die Wirkung von Makroliden, sondern auch die Wirkung von Lincosamiden und B-Komponenten der Streptogramine blockiert. Es ergibt sich eine Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B Resistenz (MLS<sub>B</sub>-Phänotyp) [15, 39, 41-44]. Das *ermB* Gen ist auf konjugativen Multiresistenzplasmiden wie z.B. Tn 1545 zu finden [41].

Kürzlich wurde an einem Stamm in Griechenland auch das *ermA* Gen isoliert, welches ebenfalls für eine 23SrRNA Methylase codiert [45].

Zusätzliche Resistenzmechanismen wurden für *S. pneumoniae* beschrieben [23, 24, 26, 46]. Tait-Kamradt et al. untersuchten *S. pneumoniae* Isolate, die durch Passagierung in subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin selektiert wurden. Diese Isolate zeigten ungewöhnliche ML- oder MS<sub>B</sub>-Phänotypen und trugen Mutationen in der 23S rRNA oder im ribosomalen Protein L4 [23, 24].

Als Resistenz vermittelnde Mutationen in der 23S rRNA wurden C2611A, C2611G, A2058G und A2059G beobachtet. Für die B-Komponente der Streptogramine wurden die Mutationen C2611A, C2611G und A2058G gefunden. Alle diese Mutationen bewirken eine Resistenz gegenüber 14-, 15- und 16-gliedrigen Makroliden. Eine Resistenz gegenüber den B-Komponenten der Streptogramine zeigt sich bei den Mutationen A2058G und A2059G. Für die Resistenzentwicklung ist eine Mutation in allen vier Allelen der 23S rRNA nicht zwingend notwendig, wobei aber eine ansteigende Anzahl der Allel-Mutation auch das Resistenzniveau hebt [23, 24].

Neben den bereits beschriebenen Resistenzmechanismen gibt es noch weitere Mutationen, die für die Resistenz gegenüber Makroliden kodieren. Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22, die primär an die Domäne I in der 23S rRNA binden, können zu Störungen in der Konformation der Domänen II, III und V führen und somit die Wirkung der Antibiotika, die mit den Nukleotiden im Peptidyltransferasezentrum der Domäne V interagieren, nachhaltig stören [39, 46]. Depardieu und Courvalin identifizierten bei *S. pneumoniae* eine weitere Mutation A2062C, die eine Resistenz gegenüber 16-gliedrigen Makroliden und Streptograminen vermittelt [7].

In Osteuropa und Nordamerika wurde bei 16 *Streptococcus pneumoniae* Isolaten, die einen MS<sub>B</sub>-Phänotyp aufwiesen, in einer konservierten Region des L4-Proteins eine 3 Aminosäuren umfassende Mutation nachgewiesen: 69-GTG-71 zu 69-TPS-71. Bei einem weiteren Isolat wurde in dieser Region eine über 6 Aminosäuren große Insertion gefunden: 69-GTGRAR-74 zu 69-GTGREKGTGRAR-80 [24]. Des Weiteren wurden Mutationen mit einem singulären Aminosäureaustausch (G96C) sowie die Insertion von zwei Aminosäuren (67-QK-68 zu 67QSQK-70) beschrieben [23].

### 1.3 Tetrazyklinresistenz

Tetrazykline sind Produkte verschiedener Streptomyces-Arten mit einem tetrazyklischen Ringsystem und einem breiten Wirkspektrum. Nachteilig sind die z.T. sehr hohen Resistenz- und Kreuzresistenzraten. Tetrazykline binden an die 30s-Untereinheit von Ribosomen und verhindern dadurch die Anlagerung von t-RNS an die m-RNS. So erklärt sich die bakteriostatische Wirkung der Tetrazykline. Resistenzen werden auf Plasmid-DNS kodiert und beruhen entweder auf einer Bindung an Ribosomen oder auf einer Hemmung der Penetration ins Zytosol.

Für *S. pneumoniae* ist lediglich ein einziger Resistenzmechanismus beschrieben. Dieser wird durch die Gene *tetM* und *tetO* kodiert, wobei das *tetM* Gen hauptsächlich auf Transposons (TN1545 und Tn5251) oder Plasmiden zu finden ist [41]. In Südafrika wurde kürzlich das *tetO*-Gen in einigen *S. pneumoniae* Isolaten gefunden und wies hier eine 75%-ige Homologie zu *tetM* auf [27]. Es ist immer noch unklar, wie die Ribosomen vor den Tetrazyklinen durch die tet-Resistenzfaktoren geschützt werden. Es wird vermutet, daß Tetrazykline über ein GTP abhängiges System entfernt werden. Früher wurde angenommen, daß *tetO* nicht mit der Bindung der Tetrazykline an die Ribosomen interferiert [12, 47]. Dies ist aber nur in Abwesenheit von GTP der Fall. In Anwesenheit von GTP konnte gezeigt werden, daß *tetM* die Entfernung der Tetrazykline von den Ribosomen katalysiert. Hierbei ist die Hydrolyse von GTP notwendig, da die Substitution von 5'-Guanylimidodiphosphat, einem nicht hydrolysierbaren Derivat von GTP, nicht ausreicht, um die vollständige Ablösung der Tetrazykline vom Ribosom herbeizuführen [41]. Auffällig hierbei ist die Ähnlichkeit zwischen den N-terminalen Regionen der Tet-Strukturen und den Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu. Die N-terminalen Regionen der Elongationsfaktoren sind an der GTP-GDP Bindung beteiligt [48]. Die Sequenzähnlichkeiten sind wahrscheinlich deswegen zu beobachten, weil alle diese Proteine GTP in ihren Katalysationsreaktionen gebrauchen. *TetM* besitzt eine GTPase, welche für die Resistenzentwicklung notwendig ist. Erfolgt eine Substitution der GTP-bindenden Domäne in *tetO*, so geht die Tetrazyklinresistenz verloren [12, 41]. Interessanterweise reichen bereits geringe Mengen *tetO* und *tetM* aus, um eine Resistenz zu bewirken. *TetO* und *tetM* scheinen demnach eine katalytische Funktion zu besitzen.

Außerdem nimmt man an, daß *tetM* in eine tRNA Modifikation involviert sein könnte, da in *Escherichia coli* Stämmen, die im *miaA* Genlocus Mutationen aufwiesen, bei Anwesenheit von *tetM* eine erniedrigte Tetrazyklinresistenz beobachtet wurde [49]. Das *miaA* Gen codiert eine Enzymaktivität, bei der die Position A37 modifiziert wird. Diese Position liegt sofort 3'

des Anticodons der tRNA, die Codons beginnend mit U abliest [50]. Burdett nahm an, daß *miaA tetM* hindern könnte, die tRNA-Interaktion ausreichend zu stabilisieren, so daß die Proteinbiosynthese normal ablaufen kann [41, 49]. Bereits 1982 konnten Burdett et al. drei Determinanten der Tetrazyklinresistenz identifizieren: *tetL*, *tetM* und *tetN* [51]. Einige Jahre später stellte man fest, daß *tetL* für den aktiven Efflux der Tetrazykline verantwortlich ist [52]. *TetN* tauchte nur selten auf, wohingegen *tetM* in zahlreichen Bakterien, wie z.B. *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Gardnerella vaginalis*, gefunden wurde [53-58], welche bei den sexuell übertragbaren Infektionen eine große Rolle spielen [59]. 1986 wurde die Nukleotidsequenz des *tetM* Gens entschlüsselt [54]. Taylor et al. berichten in ihrer Arbeit von drei Tetrazyklin-Resistenz-Mechanismen [38]: ein energieabhängiger Efflux, eine Veränderung des ribosomalen Proteins und eine enzymatische Inaktivierung des Tetrazyklins, welche aber sehr selten vorkommt und erstmalig in einer Arbeit von Speer beschrieben wurde [60]. In einer großen Studie wurden von 1979 bis 1990 in Spanien 1492 Pneumokokken bezüglich ihrer Resistenz gegenüber Antibiotika getestet. Die Inzidenz der Penicillin-resistenten Stämme nahm von 4,3% in 1979 auf 40% in 1990 zu. Die Erythromycin-resistenten Stämme nahmen von 0% in 1979 auf 9,4% in 1990 zu. Auffällig war zu diesem Zeitpunkt die Abnahme der Inzidenz der Tetrazyklin-resistenten Stämme von 76,1% auf 37,6% [61]. In den darauf folgenden Jahren nahm die Antibiotika-Multiresistenz der Pneumokokken weltweit stetig zu. In Südafrika zum Beispiel war ein Anstieg der Multiresistenz der Pneumokokken in den Jahren 1991-1998 von 2,2 auf 3,8% zu verzeichnen [62]. In Belgien stieg die Tetrazyklinresistenz in den Jahren 1994 bis 1998 von 14,9 auf 28% an [63].

### 1.4 Chinolonresistenz

Chinolone (Gyrase-Hemmer) sind chemisch synthetisierte Substanzen. Sie sind oral verfügbar, haben eine hohe Wirksamkeit und eine gute Gewebediffusion. Ein Zwischenprodukt der Chloroquin-Synthese erwies sich Anfang der sechziger Jahre als antibakteriell wirksam. Daraus entstand 1962 die Nalidixinsäure, die als Nogram<sup>®</sup> zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingeführt wurde. Da sie schlecht resorbiert wird, nur ein enges Spektrum von Erregern erfaßt und sehr schnell Resistenzen erzeugt, errang diese Substanz keine große Bedeutung. Erst die Variation des Substitutionsmusters führte zu wirksamen Antibiotika, die heute breit eingesetzt werden.

Ein wichtiger Meilenstein in der Geschichte der Gyrasehemmstoffe ist die Pipemidsäure, die auf Grund des zusätzlichen Piperazinringes eine deutlich verbesserte Pharmakokinetik und eine gute Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* zeigt. Der Durchbruch gelang erst mit der Einführung des Fluoratoms in Position 5 des Chinolon-Grundgerüsts. Die seitdem als Fluorochinolone bezeichnete Substanzgruppe, deren erster Vertreter das 1978 in den Handel gebrachte Norfloxacin war, hat eine gute Bioverfügbarkeit, eine längere Halbwertszeit und trifft vor allem ein breiteres Erregerspektrum, insbesondere im gramnegativen Bereich. In den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden dann schnell nacheinander Pefloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin auf den Markt gebracht. Ciprofloxacin und Ofloxacin, die auch gegen grampositive Keime wirksam sind, können wohl als die potentesten Mittel dieser Gruppe angesehen werden. Diese Substanzen der zweiten Generation können gegen Infektionen der tieferen Atemwege, bakterielle Darmerkrankungen - hier Mittel der ersten Wahl, insbesondere bei Salmonelleninfektionen -, Harnwegsinfektionen, bei unkomplizierter Gonorrhoe oder Infektionen der Knochen eingesetzt werden. In vielen Fällen sollten sie aber als Mittel der zweiten Wahl benutzt werden, da  $\beta$ -Lactamantibiotika oder die Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol ein breiteres Wirkspektrum bei meist günstigerem Nebenwirkungsspektrum zeigen. Der große Vorteil der Fluorochinolone liegt sicher in ihrer guten peroralen Bioverfügbarkeit, was bedeutet, daß sie ambulant gut einsetzbar sind.

Da aber bei weitem noch nicht alle Erreger mit diesen Fluorochinolonen getroffen werden konnten, die Halbwertszeit nicht genügend lang war und es beträchtliche Interaktionen mit anderen Arzneistoffen wie zum Beispiel dem Theophyllin gab, suchte man nach Substanzen mit besserer Pharmakokinetik und antibakterieller Wirksamkeit. Seit 1977 ist bekannt, daß die Fluorochinolone die Topoisomerase II, auch Gyrase genannt, hemmen.

Angriffspunkte der Chinolone sind die Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV, wobei beide Enzyme der Topoisomerase II zuzuordnen sind. Die Topoisomerasen ermöglichen eine Entdrillung oder auch „Relaxation“ der DNS-Doppelhelix und spiralisieren („supercoiling“) sie anschließend wieder. Man unterscheidet eine Topoisomerase I von einer Topoisomerase II. Die Topoisomerase I katalysiert ausschließlich die „Relaxation“ der DNS. Die Topoisomerase II, ein Tetramer bestehend aus *gyrA* und *gyrB*, katalysiert die „Relaxation“ und das „supercoiling“. Alle Gyrase-Hemmer binden an die A-Untereinheiten (*gyrA*) bakterieller Topoisomerase II und zerstören die DNS. Eine Hemmung der Gyrase bewirkt eine fehlende Überspiralisierung der DNS und damit einen vergrößerten Raumbedarf für das Bakterienchromosom. Als Energielieferant für diese Reaktion fungiert das ATP. Resistenzmechanismen gegen die Wirkung der Gyrase-Hemmern zeigen sich entweder in

einer verminderten Permeabilität der Zellmembran oder der verminderten Affinität der Gyrasen gegenüber Hemmstoffen. Solche Veränderungen sind bisher nur als chromosomale Mutationen bekannt. Zum ersten findet eine Mutation der Gyrase-Gene an den Positionen statt, an denen die Aminosäuren kodiert sind, die für die Bindung der 4-Chinolone verantwortlich sind. Hier gibt es Kreuzresistenzen zwischen allen 4-Chinolonen (Ausnahme 2-Pyridone). Da diese Resistenz chromosomaler Art und nicht auf Plasmiden kodiert ist, wird sie langsamer verbreitet als Resistenzformen bei anderen Antibiotikagruppen. Bei einem zweiten Mechanismus gelangen hydrophile Chinolone mit Hilfe von Porinen (transmembranale Transportproteine) in die Bakterienzelle hinein. Bei resistenten Keimen hat man eine verminderte Bildung dieser Porine gefunden, was die 4-Chinolon-Konzentration in der Bakterienzelle senkt. Zusätzlich wird im Rahmen der Resistenz ein erhöhter aktiver Auswärtstransport der 4-Chinolone durch die Expressierung von Effluxproteinen beobachtet. Beide Enzyme, Gyrase und Topoisomerase IV, haben einen ähnlichen Aufbau der Untereinheiten. Sie bestehen aus je zwei Paaren identischer Untereinheiten, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. Für die Gyrase sind es *gyrA* und *gyrB* und für die Topoisomerase IV sind es *parC* und *parE*. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV besteht in der Trennung der Tochterchromosomen sowie der Decatenierung, die eine Voraussetzung der Zellreplikation darstellen, da die Chromosomen nach einer Replikationsrunde als Catenane ineinander verkettet vorliegen [8]. Die A-Untereinheiten der Enzyme sind vor allem für die Wechselwirkungen mit der DNA, die B-Untereinheit für die ATP-Bindung verantwortlich. Chinolone binden mit einer hohen Affinität an den Enzym-DNA-Komplex und verhindern das Wiederverschließen der Doppelstrangbrüche durch Stabilisierung eines tertiären spaltbaren Komplexes aus Enzym, DNA und Chinolon. Dieser spaltbare Komplex aus Enzym, DNA und Chinolon wird im Rahmen der Replikation irreversibel fixiert, das Enzym löst sich von der DNA, die Topoisomerasen zerfallen in ihre Untereinheiten und es kommt zur Freisetzung der freien DNA-Enden [8]. Chinolonantibiotika bewirken eine Veränderung der Zielstruktur und verringern die Substanzkonzentration am Wirkungsort. Für Chinolone als synthetische Substanzen sind bisher keine bei Bakterien vorkommenden Enzyme bekannt, die diese Substanzen inaktivieren können. Die beschriebenen Resistenzen erfolgen aufgrund von Mutationen in Gyrase und Topoisomerase IV. Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist die *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR) der *gyrA* und *parC* Gene [8, 10, 14, 17, 25, 64-67]. Die Mutationsfolge ist je nach Kombination zwischen Chinolon und Bakterienart eventuell unterschiedlich. Grundsätzlich wurde angenommen, daß die Topoisomerase IV immer das primäre Target der Chinolone in gram-positiven Bakterien ist

[17]. Untersuchungen bezüglich des primären Targets sind allerdings in *in-vitro* bzw. *in-vivo* Studien widersprüchlich und keinesfalls geklärt [68]. Man nahm an, daß sich zunächst die Topoisomerase VI in *parC* durch Mutationen verändert. In ihren Untersuchungen konnten Pan und Fischer allerdings zeigen, daß durch Sparfloxacin zunächst *gyrA* selektiert wurde bevor eine Mutation bei der Topoisomerase IV in *parC* erfolgte. Fukuda et. al fanden heraus, daß Ciprofloxacin und Levofloxacin Topoisomerase IV als primäres Target haben [10, 25].

Ein weiterer Resistenzmechanismus der Pneumokokken gegenüber Chinolonen wird durch die Effluxpumpe, einem  $H^+$ -abhängigen System der *multidrug transporter*-Gruppe aus der Familie der *major facilitators* vermittelt. Diese Pumpen befördern hydrophile Chinolone aus der Zelle. Eine Reihe solcher Multidrug-Resistance-Effluxproteine ist in der letzten Zeit charakterisiert worden, zum Beispiel die NorA-MDR-Pumpe, die bei Chinolon-resistentem *Staphylococcus aureus* gefunden wurde [69]. Diese Pumpe transportiert hydrophobe Kationen wie am Piperazinring protoniertes Norfloxacin aus der Bakterienzelle. Aus *Berberis fremontii* wurde in diesem Jahr 5'-Methoxyhydnocarpin isoliert, das den Auswärtstransport sowohl von Berberin, dem natürlichen Substrat der Pumpe, als auch von Norfloxacin hemmt. Die Substanz, die selbst keine antibakterielle Aktivität aufweist, potenziert den Berberin- und Norfloxacin-Effekt, indem die Resistenz überwunden wird. Von weiteren Effluxpumpenhemmern ist kürzlich berichtet worden [70]. Sie geben Anlaß zur Hoffnung, daß das Resistenzproblem künftig in Grenzen gehalten werden kann. Die Resistenzlage ist in Bezug auf empfindliche Keime insgesamt positiv und seit 1995 nahezu konstant. Das schließt nicht aus, daß es hohe Resistenzraten bei unempfindlichen Keimen gibt [71, 72] So wurde in *S. pneumoniae* mit PmrA ein neues Effluxsystem identifiziert [11, 28, 73]. Durch Reserpin sind diese Pumpen hemmbar, so daß die MHK-Werte der durch Überexpression der Effluxsysteme resistent gewordenen Bakterien unter Reserpin-Einfluß sinken. Eine deutliche MHK-Steigerung um mehr als 1-2 Stufen zeigt sich jedoch erst in Kombination von Überexpression der Effluxpumpe und einer Mutation in den Genen der Gyrase oder der Topoisomerase IV. Eine alleinige Überexpression von Effluxpumpen lässt den MHK nur um 1-2 Stufen ansteigen. Chen et al. beschrieben in kanadischen *Surveillance-Studien* in den Jahren 1993-1998 ebenfalls eine ansteigende Chinolonresistenz von 0 auf 1,7% für Ciprofloxacin [74, 75]. Generell ist die Resistenz gegen Fluorchinolone bei Pneumokokken in Europa noch relativ selten [76, 77], während aber in anderen Ländern ein Zunehmen der Resistenzentwicklung beobachtet wurde [78]. Bei Zugabe von Reserpin zur Blockierung der Effluxpumpe [64] wurde bei den vier sequenzierten Isolaten mit einem Levofloxacin MHK-

Wert von  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  ein Abfall der MHK-Werte um 2-3 Stufen beobachtet, so daß an der Resistenzausprägung ebenfalls ein aktiver Efflux der (hydrophilen) Chinolone beteiligt ist.

Die klassischen Alterationen bei *Streptococcus pneumoniae* finden sich an Codon-Position 81 für *gyrA* und an den Positionen 79 und 83 in *parC*. Zwar wurden in *gyrB* und *parE* ebenfalls Mutationen beschrieben, diese haben aber offenbar klinisch keine große Bedeutung [10, 14, 18, 64, 66].

### 1.5 Trimethoprim/ Sulfamethoxazol-Resistenz

In Kombination mit anderen Hemmstoffen wie der Folsäureantagonisten (z.B. Trimethoprim oder Pyrimethamin) wirken Sulfonamide besser. Trimethoprim und Sulfamethaxol sind in Form des Kombinationspräparates Cotrimoxazol ein gebräuchliches Antibiotikum.

Folsäureantagonisten hemmen die bakterielle Biosynthese von Tetrahydrofolsäure, indem sie als „falsches Substrat“ mit der Dihydrofolsäurereduktase (DHFR) interagieren und so die Bildung von Tetrahydrofolsäure aus Dihydrofolsäure hemmen. Tetrahydrofolsäure spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Bausteinen der DNS und RNS in Form von Purinnucleotiden und Thymin. Durch Folsäureantagonisten werden das Wachstum und die Zellteilung gehemmt, da die für die Synthese von Purinen und Thymin nötige Tetrahydrofolsäure gehemmt wird. Wenn Tetrahydrofolsäure der Zelle nicht zur Verfügung steht, scheint sie aus Thyminmangel abzusterben [13, 41]. Folsäureantagonisten wirken demnach bakterio­statisch.

Sulfonamide sind kompetitive Antagonisten der para-Aminobenzo­esäure. Sie hemmen die Dihydrofolsäure-Synthase zu einem früheren Zeitpunkt, indem sie als Antimetabolit mit p-Aminobenzo­esäure konkurrieren, das durch die Dihydropteroinsäuresynthetase zu 7,8-Dihydropteroinsäure umgewandelt wird. Der daraus resultierende Mangel an Desoxythymidintriphosphat stoppt die DNA-Synthese. Die Kombination von Sulfonamiden und Folsäureantagonisten zeigt somit eine synergistische Hemmung der Tetrahydrofolsäure-Produktion (Abbildung 1). Eine Veränderung der Dihydrofolatreduktase (DHFR) bewirkt eine zunehmende Resistenz gegen Trimethoprim. Entweder erfolgt eine Mutation im chromosomalen Gen oder eine Aufnahme eines exogenen Gens, welches weniger sensibel für die DHFR als die Wildtyp-DHFR gegenüber Trimethoprim kodiert [13, 41]. Diese exogenen Gene sind häufig auf Transposons oder Plasmiden zu finden. Die Trimethoprimresistenz ist bei Pneumokokken stärker mit der Cotrimoxazolresistenz korreliert als die Sulfamethaxolresistenz. Für die Sulfonamidresistenz ist eine chromosomale Mutation verantwortlich. Es kommt entweder zu einer Überproduktion von p-Aminobenzo­esäure oder

zu einer veränderten Durchlässigkeit des Bakteriums für Sulfonamide. Möglich wäre auch die Aufnahme von Genen, die für Enzyme wie DHPS (Dihydropteroatsynthetasen) kodieren und nicht länger sensibel gegen Sulfonamide sind. Bei Pneumokokken scheinen chromosomale Mutationen eine wichtige Rolle zu spielen [13, 41, 79, 80]. In vorherigen Studien wurde ein Ile100Leu Austausch entdeckt, der äquivalent mit der Alteration an Ile94 bei E.coli ist [6]. Diese Position ist an der Hydrogenbindung an die 4-Aminogruppe des Trimethoprim beteiligt. Ein Ersatz von Isoleucin durch Leucin führt wahrscheinlich zu einer Aufhebung der Bindung, ohne die DHFR-Bindung zu beeinflussen [41]. So kann die Bildung von Tetrahydrofolsäure auch weiterhin selbst in Gegenwart von Trimethoprim stattfinden. Vorausgehende Studien zur Sulfonamidresistenz in einer Labormutante erbrachten eine Duplikation der Aminosäuren 66 und 67 (*sul-d*) in *sulA*, dem chromosomalen DHPS Gen [41]. Nachfolgend zeigten sich im Rahmen von Sequenzvergleichen empfindlicher und resistenter klinischer Pneumokokken-Isolate Duplikationen von entweder 3 oder 6 Basen, die eine Wiederholung von 1 oder 2 Aminosäuren in der Region von Codon Arg58 zu Tyr63 in der DHPS resistenter Isolate hervorrufen [13, 41, 79, 80]. Durch die zunehmende Entwicklung von Resistenzen haben die Sulfonamide an Bedeutung verloren. 1972 wurde zum ersten Mal über die Cotrimoxazol-Resistenz berichtet [81]. Sie nimmt weltweit dramatisch zu [82]. Als 1960 nach der Einführung des Cotrimoxazols die ersten resistenten Isolate von *S. pneumoniae* gefunden wurden [81], konnte man eine stetige Zunahme der Resistenz in Italien von 1 auf 5% und von 15 auf 80% in Spanien, USA und Südafrika beobachten [82].

In Südafrika sind 64% der Pneumokokken resistent gegenüber Cotrimoxazol [6]. In Spanien kann man einen Anstieg der Cotrimoxazol-Resistenz bei Kindern mit Otitis media von 64% in 1992 und auf 81% in 1996 verzeichnen [83]. Die Cotrimoxazol-Resistenz stieg in England von ursprünglich 8,4% (1994-1995) auf 12,6% (1996-1997), während die Rate in Irland bei 16,1% lag [84]. Auffällig ist, daß Penicillin-resistente Isolate von *S. pneumoniae* oftmals mit einer Multiresistenz gegenüber Cotrimoxazol assoziiert sind [82]. Beängstigende Zahlen fand man hierzu zum Beispiel in Spanien, wo 26% der Cotrimoxazol-resistenten Stämme mit Penicillin-Resistenz gekoppelt waren [85]. In Südafrika waren 42,5% der bei Kindern gefundenen Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* auch gegenüber Cotrimoxazol resistent [86, 87]. Insgesamt scheint die Multiresistenz eine zunehmende Bedrohung darzustellen.

## 1.6 $\beta$ -Laktam-Resistenz

Die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika wird bei *S. pneumoniae* durch veränderte Penicillin-Binde-Protein (PBP) verursacht. Diese Enzyme sind essentielle, membrangebundene Enzyme, die an späteren Schritten der Mureinbiosynthese beteiligt sind. Inzwischen sind sehr viele Sequenzen von PBP-Genen und entsprechend abgeleitete Proteinsequenzen bekannt. PBPs sind Multidomänproteine, die neben einer N- und C-terminalen Domäne auch eine „Penicillinbindungsdomäne“ enthalten. Auf ihr lassen sich drei Peptidmotive nachweisen, die auch in  $\beta$ -Lactamasen der Klasse A und C vorkommen. Die Ser XxxXxx-Lys-Box mit dem aktiven Ser, ein SerSxxAsn-Motiv und eine Lys(Ser/Thr)Gly-Sequenz [88]. Diese Proteine werden als Penicilloyl-Serin-Transferasen zusammengefaßt. Aufgrund von Homologievergleichen kann man diese in drei Klassen einteilen: hochmolekulare PBP (hmm, hmw) der Klasse A und B und niedermolekulare PBP (lmm, lmw). Im Allgemeinen werden die hmm PBP als die essentiellen PBP und damit als die wichtigen primären Targets für  $\beta$ -Laktamantibiotika angesehen. Je nach Antibiotikum sind die zur Inhibierung nötigen Konzentrationen verschieden. Niedrige bis intermediäre Resistenz gegen Cefotaxim und Oxacillin werden durch Veränderungen in PBP2x, gegen Piperacillin durch PBP2b vermittelt [89, 90]. Hohe Resistenzen, wie sie in klinischen Isolaten beobachtet werden, sind das Resultat von sehr komplexen Veränderungen, die nicht nur ein sondern mehrere PBP betreffen [88]. Aus der Klasse der  $\beta$ -Laktamantibiotika wurden stellvertretend für die Penicilline die MHK-Werte gegenüber Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Penicillin G ermittelt (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998). Vertreter der Cephalosporine waren Cefadroxil, Cefaclor, Ceftributen, Cefprozil, Cefuroxim, Cefixim, Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidime, Cefepim und Loradarbef. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Verteilung der MHK-Werte für die verschiedenen  $\beta$ -Laktamantibiotika.

## 1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurde die gegenwärtige Genetik der Makrolid-resistenten Pneumokokken hinsichtlich der beiden oben erwähnten Gene *ermB* und *mefE* untersucht und es wurde ein Screening der Mutationen auf ribosomaler Ebene durchgeführt. Weiterhin fand ein Vergleich der MHK-Werte der Makrolid-resistenten Pneumokokken für 30 Antibiotika statt und im Anschluß erfolgte die Diskussion über die Resistenzentwicklung und den möglichen Einsatz neuer Substanzen, wie z.B. der Ketolide.

Darüberhinaus erfolgte die Analyse der Genetik Tetrazyklin-resistenter Pneumokokken und wiederum wurden die MHK-Werte für 30 Antibiotika ermittelt. Desweiteren wurde die Genetik Chinolon-resistenter Pneumokokken im Hinblick auf die Gyrase und Topoisomerase analysiert und die *in-vitro* Aktivitäten neuerer Chinolone getestet. Als weitere mögliche therapeutische Alternative der Behandlung Antibiotika-resistenter Pneumokokken konnte Sulfamethoxazol eingesetzt werden. Daher wurden die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen näher analysiert und die *in-vitro* Aktivität getestet. Abschließend erfolgte die genetische Aufarbeitung der  $\beta$ -Laktam-resistenten Pneumokokken, da  $\beta$ -Laktame weiterhin Mittel der Wahl bei pneumonischen Erkrankungen sind.

Generell erfolgte bei allen getesteten Antibiotikaklassen parallel eine genetische Analyse zugrunde liegender Resistenzmechanismen sowie eine *in-vitro* Testung bekannter und neuerer Substanzen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterien

Bei den bearbeiteten Bakterien handelte es sich um die grampositive Spezies *S. pneumoniae*. Vor der Bearbeitung der Bakterienspezies erfolgte ein Ausstreichen auf Blutagarplatten zur Überprüfung der Isolate auf die korrekte Spezieszuordnung. Die Testung der Pneumokokkenstämme erfolgte anhand des *MicroScan Walk Away 96 Systems* (Tabelle 5). Die Pneumokokken wurden zusätzlich einer Prüfung auf Optochinempfindlichkeit unterzogen, wobei eine Sensibilität für das Vorliegen dieser Spezies sprach. Anschließend fand eine Überführung sämtlicher positiv getesteter Isolate auf die Mikrobank statt, um zu gewährleisten, daß eine kontaminationsfreie Archivierung der Isolate stattfand. Die Anzüchtung und Aufbewahrung ausgestrichener Pneumokokken erfolgte in einem mit CO<sub>2</sub> angereicherten Brutschrank bei 37°C.

#### 2.1.1 Streptococcus pneumoniae

Bei dieser Spezies handelt es sich um grampositive, ovale bis lanzettförmige Diplokokken, die physiologisch in 40-70% bei gesunden Erwachsenen in der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes vorkommen. Pneumokokken sind von einer dicken Kapsel umgeben, die sie vor der Phagozytose schützt. Die Kapsel stellt den wichtigsten Virulenzfaktor dieser Bakterien dar, denn kapsellose Varianten können keine Krankheiten hervorrufen. *Streptococcus pneumoniae*-Infektionen gehen in der Regel von der eigenen Flora aus (endogene Infekte), wobei kardiopulmonale Grundleiden, vorausgegangene Infektionen (z.B. Influenza), Milzextirpation und Komplementdefekte prädisponierende Faktoren sind. Die wichtigsten Pneumokokkeninfektionen sind die Lobär- und die Bronchopneumonie. Weitere Erkrankungen sind die akute Exazerbation der chronischen Bronchitis, die Otitis media, Sinusitiden, Meningitiden und das Ulcus cornea [91].

Die untersuchten Isolate entstammten einer Sammlung, die im Rahmen der *SENTRY* Studie im Zeitraum 1997-99 untersucht wurden. Insgesamt wurden 1191 Pneumokokken-Isolate aus Kliniken in Österreich, Belgien, Frankreich, Deutschland, Griechenland, Italien, den Niederlanden, Polen, Portugal, Spanien, Schweiz, England, der Türkei und Israel gesammelt und untersucht. Die gesammelten Isolate wurden von Patienten mit positiven Blutkulturen (18%) sowie mit ambulant (72%) bzw. nosokomial erworbenen (10%) Pneumonien gewonnen

und auf ihre MHK-Werte und *in-vitro* Aktivitäten mit verschiedenen Substanzen getestet. Auf der Basis dieser Daten wurden die in der vorliegenden molekulargenetischen Studie untersuchten Stämme ausgewählt. Die durch die *SENTRY* Studie ermittelten MHK-Werte wurden durch unsere eigene MHK-Untersuchung für Faropenem und Telithromycin (Tabelle 6) durch eine Mikrotiterverdünnungsmethode mit Antibiotikakonzentrationen von 0,004 - 64 µg/ml ergänzt [29]. Die MHK-Werte für die anderen Antibiotika lagen im Rahmen der *SENTRY* Studie bereits vor.

Nach einer Inkubation für 20-24 Std. im Müller-Hinton Nährmedium mit Zusatz von 3% lysiertem Pferdeblut wurden die MHK-Werte bestimmt, indem die niedrigste Konzentration ermittelt wurde, bei der kein Bakterienwachstum mehr vorhanden war. Der Stamm *S. pneumoniae* ATCC 49619 diente als sensibler Kontrollstamm.

### 2.1.1.1 Herkunft der Bakterienstämme

42	Isolate: Österreich
76	Isolate: Belgien
232	Isolate: Frankreich
204	Isolate: Deutschland
16	Isolate: Griechenland
48	Isolate: Israel
72	Isolate: Italien
32	Isolate: Niederlande
136	Isolate: Polen
17	Isolate: Portugal
186	Isolate: Spanien
90	Isolate: Schweiz
38	Isolate: England
2	Isolate: Türkei

## 2.2 Chemikalien

### 2.2.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen

Dextranblau / EDTA: 25mM EDTA pH 8,0; 50 mg/ml DB

Formamid (Verhältnis Formamid: DB/EDTA 5:1, Ambresco)

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

10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung = APS (Ambresco)

1,0g Ammoniumpersulfat

10,0 ml H<sub>2</sub>O

10 x conc. TBE-Puffer (für 1l)

108,0 g 890 mM Tris Base

55,0 g 890 mM Borsäure

7,4 g 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA

TEMED = N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (Ambresco)

Bluemarker (6 x conc. Gelladungspuffer, Gibco BGL)

Bromphenolblau (0,25% w/v) = BPB

Xylenecyanole FF (0,25% w/v)

Sucrose (40% w/v)

Mit Glycerin 1:1 verdünnt

1 Kb DNS Molekulargewichtsmarker (10 µl Aliquots mit 1 µg Marker, Gibco BGL)

1,0 µl Marker

7,5 µl Aqua bidest.

1,5 µl 6xBPB

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, BioRad)

10 mM Tris-Cl (pH 8,5, Merck)

Mikrobank mit Kryolösung und porösen Keramik-Kügelchen (Pro-Lab)

Neg./Post. BP-Kombo-Platte Typ 1E/4 E nach DIN (DADE Microscan)

### 2.2.2 Antibiotika

Innerhalb der *SENTRY* Studie wurde die Sensibilität der Isolate gegen folgende Antibiotika getestet:

Ciprofloxacin	Levofloxacin	Sparfloxacin	Gatifloxacin
Trovafoxacin	Grepafloxacin	Erythromycin	Clindamycin
Azithromycin	Clarithromycin	Quinupristin	Rifampicin
Tetracyclin	Trimethoprim	Vancomycin	Chloramphenicol
Amoxicillin/Clav.	Penicillin	Cefadroxil	Cefaclor
Ceftibuten	Cefprozil	Cefuroxim	Cefixime
Cefotaxime	Cefpodoxime	Ceftazidim	Cefepim
Loracarbef			

### 2.2.3 Testblättchen

Optochin	(50 µg pro Testblättchen, Oxoid)
Doxycyclin	(30 µg pro Testblättchen, Oxoid)
Erythromycin	(10 µg pro Testblättchen, Oxoid)
Sulfameth./Trimethoprim	(23,75 µg /1,25µg pro Testblättchen, Oxoid)
Clindamycin	(10 µg pro Testblättchen, Oxoid)
Rifampicin	(5 µg pro Testblättchen, Oxoid)
Ciprofloxacin	(5 µg pro Testblättchen, Oxoid)

### 2.2.4 Kits

Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

1. Enzyme mix, high fidelity (Taq-Polymerase)
2. Expand HF buffer, 10 x conc. without MgCl<sub>2</sub>
3. MgCl<sub>2</sub> stock solution: 25 mM MgCl<sub>2</sub>

PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim)

Quiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen)

ABI PRISM<sup>TM</sup> dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Premix, Perkin Elmer)

### 2.3 Primer (Gibco BGL)

Die Auswahl der spezifischen Primersequenzen erfolgte anhand von Literaturangaben mit Modifizierungen entsprechend der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen. Anschließend synthetisierte die Firma Gibco BGL den Vorgaben entsprechend die Primer. Die spezifischen Primer wurden bei den Pneumokokken zusätzlich mit einer *Tag*-Primersequenz ausgestattet, die als Anhängsel an die spezifische Primersequenz angefügt waren und für alle Genloci (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *ermB*, *mefE*, *tetM*, *tetO*, *sulf1/2*, *sulf3/4*, *tri1/2*, 23SRNA, L4, L22) die gleichen Sequenzen aufwiesen. Diese Produkte aus spezifischen Primern und *Tag*-Primern fanden in der PCR Verwendung. Dies hatte den Vorteil, daß in der Sequenzierreaktion für alle Genloci der *Tag*-Primer ohne die spezifische Primersequenz eingesetzt werden konnte.

#### 2.3.1 *S. pneumoniae* (spezifische Primersequenzen)

[6, 24, 27, 79, 80, 92-94]

<b><i>gyrA</i>:</b>	forward: 5'-CCGTCGCATTCTTTACG-3' reverse: 5'-AGTTGCTCCATTAACCA-3'
<b><i>gyrB</i>:</b>	forward: 5'-TTCTCCGATTTCTCATG-3' reverse: 5'-AGAAGGGTACGAATGTGG-3'
<b><i>parC</i>:</b>	forward: 5'-TGGGTTGAAGCCGGTTCA-3' reverse: 5'-TGCTGGCAAGACCGTTGG-3'
<b><i>parE</i>:</b>	forward: 5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC-3' reverse: 5'-TCTGCTCCAACACCCGCA-3'
<b><i>ermB</i>:</b>	forward: 5' AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3' reverse: 5' -TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3'
<b><i>mefE</i>:</b>	forward: 5' -AAA ACT GCA GGC GTT TAA GAT AAG CTG GC3' reverse: 5' -CCA ATG CAT CCT GCA CCA TTT GCT CCT AC3'
<b><i>tetM</i>:</b>	forward: 5' -GAT ATT ATG TGG ATT CTG CGA C-3' reverse: 5' -CTC CCT AAT GGA AGC GGT GC-3'

<b><i>tetO:</i></b>	forward: 5' –TGC GGC AAG GTA TTC TTA AAT-3' reverse: 5' –ATT TTA TAT GAC TTT TGC AAG CTG-3'
<b><i>sulf1/2:</i></b>	forward: 5' –AGC CAA TCA TGC AAA GAC AG-3' reverse: 5' –GAC TAG ATC GGC ACC AGC AG-3'
<b><i>sulf3/4:</i></b>	forward: 5' – GGA ATT GGC TTT GGT CTG AC-3' reverse: 5' –ATT TTC CGC TTC ATC AGC CAG-3'
<b><i>tri1/2:</i></b>	forward: 5' –GGA AGC ATG ACT AAG AAA ATC G-3' reverse: 5' –CAC AGA AAA GCC GTG AAT AAA CC-3'
<b><i>23S5':</i></b>	forward: 5' –GGT TAA GTT AAT AAG GGC GC-3' reverse: 5' –TTT CGA CTA CGG ATC TTA GC-3'
<b><i>23S3':</i></b>	forward: 5' –CGG CGG CCG TAA CTA TAA CG-3' reverse: 5' –TTG GAT AAG TCC TCG AGC TAT TAG-3'
<b><i>23Scent:</i></b>	forward: 5' –CTG TTT GGG TGA GGG GTC C-3' reverse: 5' –ACC TGC ATC TTC ACA GGT AC-3'
<b><i>L4:</i></b>	forward: 5' –AAA TCA GCA GTT AAA GCT GG-3' reverse: 5' –GAG CTT TCA GTG ATG ACA GG-3'
<b><i>L22:</i></b>	forward: 5' –GCA GAC GAC AAG AAA ACA CG-3' reverse: 5' –ATT GGA TGT ACT TTT TGA CC-3'

2.3.1.1 *Tag-Primersequenzen*

forward: 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'  
reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

## 2.4 Nährmedien

### Müller-Hinton-Bouillon (Oxoid)

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

### Müller-Hinton-Agar, pH 7,4 (mit und ohne Schafsblut, Oxoid)

Getrocknete Infusion aus 300 g Rindfleisch	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l
evtl. Schafserythrozyten	

### BHI-Agar 37 g/l (Difco)

Nährstoffkonzentrat aus 200 g Kalbshirn	
Nährstoffkonzentrat aus 250 g Rinderherz	
Proteosepepton	10,0 g
D-Glukose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	2,5 g

## 2.5 Apparaturen

PE Cetus DNS Thermocycler (Perkin-Elmer)

DNS-Sequenzer 377 (ABI Prism)

Prompt Inokulationssystem (DADE Microscan)

## 2.6 Untersuchungsmethoden

### 2.6.1 MicroScan Walk Away 96 System (= DADE)

Die Kontrolle der bereits vorher identifizierten Pneumokokkenstämme machte eine Untersuchung durch das *MicroScan Walk Away 96 System* notwendig. Hierbei handelt es sich

um einen Computer gestützten Vollautomaten zur Inkubation von Mikrotiterplatten, der die Ergebnisse der biochemischen Identifikation und Resistenzbestimmung von Mikroorganismen selbständig durch eine photometrische bzw. fluorometrische Messung auswertet [95]. Die Mikrotiterplatten beinhalteten Testfelder, die mit spezifischen Substanzen gefüllt waren. Die Summe der Reaktionen dieser Substanzen mit den zu untersuchenden Bakterien gab Aufschluß über die Bakterienspezies und führte letztendlich zu einer Identifizierung. Bei den grampositiven Pneumokokken erfolgte die Bestimmung anhand des Mikrodilutionsverfahrens, wobei die Testfelder einer Mikrotiterplatte mit einer standardisierten Keimsuspension der zu untersuchenden Bakterien beimpft, bei 35°C bebrütet und hierbei einer qualitativen Empfindlichkeitsbestimmung unterzogen wurden. Die Bebrütung dauerte bei grampositiven Bakterien 16 bis 42 Stunden. Anschließend verglich die hierbei benutzte Software die Resultate der Resistenzbestimmung mit vorgegebenen Normalwerten. Die weitere Bearbeitung erfolgte nur an Bakterienisolaten, deren ursprüngliche Identifizierung mit der des DADE's übereinstimmte. War es zu einer abweichenden Identifizierung gekommen, wurde der DADE wiederholt. Wiederholte sich das abweichende Ergebnis, wurde die vom DADE angezeigte Identifizierung übernommen. Alle als Pneumokokken identifizierten Isolate wurden anschließend einem Optochintest unterzogen. Der positive Ausfall bewies, daß es sich bei den untersuchten Bakterien auch wirklich um Pneumokokken handelte.

#### 2.6.1.1 Testfelder der Mikrotiterplatten für *grampositive* Bakterien

Kristalviolett	Mikrokokkentest	Nitrat
Novobiocin	PNP-β-D-Glucuronid	Indoxyl-Phosphatase
Voges-Proskauer	Optochin	Phosphatase
40%iges Gallen-Äskulin	L-Pyrrolidonyl-β-naphtylamid	Arginin
PNP-β-D-Galaktopyronosid	Harnstoff	Raffinose
Laktose	Trehalose	Mannose
6,5%-iges Natriumchlorid	Sorbitol	Arabinose
Ribose	Inulin	Mannitol
Bacitracin	Pyruvat	β-Laktamase
Thymidinfreies Wachstumsfeld		

### 2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Dieses Verfahren diente der Überprüfung der Länge des PCR-Produkts, der Abschätzung der DNS-Menge nach der Sequenzierreaktion und dem Erkennen der Fragmentlängen durch einen Argonlaser bei der Sequenzierung. Das Prinzip der Gelelektrophorese bestand darin, durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (Gleichstrom) auf einem Gel aufgetragene geladene Teilchen in einer Pufferlösung nach ihrer Ladung und Größe wandern zu lassen und somit eine Trennung der Teilchen zu erreichen. Da es sich bei den DNS-Fragmenten um negativ geladene Teilchen handelte, wanderten sie in Richtung der Anode. Je weiter sie auf dem Gel wanderten, desto kürzer bzw. leichter waren die Fragmente. Die Dauer der Auftrennung richtete sich nach der Konzentration des Gels, der Fragmentgröße und der Höhe der angelegten Spannung. Sowohl die Herstellung des Gels als auch die Elektrophorese selbst fand in Plexiglas-Gefäßen statt. Bei Inbetriebnahme der Elektrophorese lag das Gel auf einem Schlitten, der in das Pufferreservoir hineinragte und von der Pufferflüssigkeit vollständig bedeckt wurde. Die Abmessung der Gele betrug ca. 12 x 25 cm.

### 2.6.3 Messung der optischen Dichte

Um die Zellkonzentration einer Bakteriensuspension zu ermitteln, erfolgte mit Hilfe eines Photometers die Bestimmung der durch die Absorption veränderten Lichtintensität einer probenhaltigen Küvette im Vergleich zum Leerwert. Die Ermittlung des Leerwertes gelang durch einen Null-Ausgleich anhand einer gereinigten, mit sterilem Wasser gefüllten Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm). Anschließend konnte die Extinktion der zu untersuchenden Probe (nach Durchmischung) gemessen werden. Bei konstanter Zellgröße war die Extinktion proportional der Konzentration der absorbierenden Substanzen und der Schichtdicke (*Lambert-Beersches Gesetz*). Da die Schichtdicke konstant war, wies die Extinktion eine Proportionalität zur Zellkonzentration auf.

### 2.6.4 Agardiffusionstest

Eine Kolonie des zu testenden Bakterienstammes wurde in 10 ml 0,9 % NaCl suspendiert und 0,5 ml dieser Suspension auf einer blutfreien *Müller-Hinton-Agarplatte* ausgestrichen. Nach dem Antrocknen erfolgte das Auflegen des entsprechenden Antibiotikatestblättchens (Filterpapier mit adsorbiertem Antibiotikum). Die anschließende Bebrütung fand bei 37 °C für 24 Std. statt. Anhand der sich durch die Diffusion des Antibiotikums im Agar

ausbildenden Hemmhöfe und der Grenzwertdichte aus der DIN-Vorschrift (nach DIN 58940), konnten Aussagen über die Resistenzlage des Bakteriums gegenüber dem getesteten Antibiotikum gemacht werden. Es erfolgte eine Einteilung in empfindlich (S), intermediär (I) und resistent (R). Der Nachweis des MLS<sub>B</sub>- oder M-Phänotyps erfolgte mittels Doppel-Blättchen-Test. Dabei wurden Erythromycin (15µg)- und Clindamycin (2µg)-Testblättchen 20 mm voneinander entfernt auf einem mit Streptokokken beimpften Mueller-Hinton-Blutagar platziert. Die Ablesung der Platten erfolgte nach 24-48 Stunden Inkubation. Das induzierbare Resistenzmuster zeigt eine Abflachung des Clindamycin-Hemmhofes in der Nähe des Erythromycin-Blättchens.

### 2.6.5 Bakterienkonservierung

Zur Gewährleistung einer sicheren Bakterienkonservierung diente die sterile Überführung einer auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonie auf die Mikrobank. Hierbei handelt es sich um sterile Plastikröhrchen mit Schraubverschluß. Der Inhalt bestand aus 1 ml flüssigem Kryomedium mit 25 Plastik Kügelchen (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. Anschließend wurde das Kryomedium mittels steriler Pipette abgesaugt. Während des Umschwenkens lagerten sich die Bakterienzellen fest an die Kügelchen an. Das sich anschließende Einfrieren erfolgte bei -20 bis -70°C. Bei der Anzuchtung der Bakterien in Flüssigmedium und dem Ausstreichen auf Agarplatten kamen die aufgetauten Kügelchen zur Verwendung.

### 2.6.6 Sterilisation

Die Sterilisation von Pipettenspitzen, Eppendorfcups, Nährmedien und destilliertem Wasser geschah im Autoklaven bei 120°C und 1,2 bar Überdruck für eine Zeit von 20 min. Die gleiche Behandlung erfuhren infektiöse Abfälle (gebrauchte Pipettenspitzen, Mediumreste, bewachsene Agarplatten usw.). Erhitzen bei 160°C für 8 Std. in einem Trockenschrank gewährleistete die Keimfreiheit der gespülten Glasgeräte. Thermolabile Stoffe wie z.B. Antibiotika wurden einer Sterilfiltration unterzogen.

### 2.6.7 PCR

Bei der verwendeten Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein hochempfindliches Verfahren, mit dessen Hilfe Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen werden können. Die Neusynthese der spezifischen Zielsequenzen der zu untersuchenden DNS führt dazu, daß am Ende des Verfahrens eine Vervielfältigung des entsprechenden DNS-Abschnittes vorliegt, entsprechend der Replikation *in-vivo*. Alle PCR-Schritte liefen automatisch in einem Thermocycler ab, der für Temperaturenwechsel und Haltezeiten programmiert war.

Um diese DNS-Neusynthese zu erzielen, wurden Doppelansätze aus dem Enzym DNS-Taq-Polymerase, einem Paar synthetischer DNS-Oligonukleotide (Primer), vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (Adenin-, Guanin-, Cytosin- und Thymintriphosphat) sowie dem zu untersuchenden DNS-Material (nicht isoliert, sondern in Form einer Bakterienkolonie) nach einer Standardmethode gewählt [96]. Eine mitgeführte Blindprobe zur Qualitätskontrolle enthielt alle aufgezählten Substanzen mit Ausnahme der Bakterien-DNS.

#### PCR-Protokoll (für 1 Ansatz)

Expand HF buffer, 10 x conc. without MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> stock solution: 25 mM MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl
Primer 1	2,0 µl
Primer 2	2,0 µl
PCR Nukleotide Mix	2,0 µl
Aqua bidest.	33,4 µl
DNS-Taq-Polymerase	0,6 µl

Die verwendete DNS-Taq-Polymerase stammte aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und war so thermostabil, so daß sich ein wiederholtes Zugeben nach jedem Denaturierungsschritt erübrigte. Die Polymerase verknüpfte die einzeln angelagerten Nukleotide zu einem kontinuierlichen Strang. Die Wahl der Sequenzen beider Primer erfolgte so, daß sie jeweils komplementär zu den zu untersuchenden gegenläufigen DNS-Strängen waren. Ferner flankierten sie den zu amplifizierenden Bereich und gewährleisteten hierdurch, daß die von der Polymerase synthetisierten DNS-Stränge gegenläufig waren. Das Hinzugeben von geeigneten Pufferlösungen und Magnesiumchlorid (von der Taq-Polymerase zur DNS-Strangverknüpfung benötigt), sorgte für ein stabiles Gemisch. Zwei Tropfen Öl verhinderten ein Verdunsten des Ansatzes während der Vorgänge im Thermocycler.

Die PCR-Reaktion lief nun in drei ineinander übergehenden Schritten ab. Es handelt sich hierbei um Denaturierung, Amplifizierungszyklus und Polymerisation. Bei der Denaturierung, die bei 94°C ablief und 2 min dauerte, erfolgte eine Trennung der DNS-Doppelhelix in ihre Einzelstränge. Der zeitliche Umfang dieses Schrittes war in der Tatsache begründet, daß ein Zugeben ganzer Bakterienkolonien und nicht etwa nur isolierter DNS stattgefunden hatte. Der sich anschließende Amplifizierungszyklus begann mit einer erneuten Denaturierungsphase bei 94°C für 60 sec, woran sich die Primerbindungsphase (*Annealing*) anschloß, die bei 55°C ablief und 60 sec dauerte. Die Temperatur dieser Phase richtete sich nach dem verwendeten Primer und stellte ein Optimum für die Anlagerung des Primers dar. Der letzte Schritt des Amplifizierungszyklus bestand in der eigentlichen DNS-Synthese mit dem Ziel einer Sequenz-Verdoppelung. Der Polymerisationsschritt lief bei 72°C ab und dauerte 60 sec. Die zeitliche Dauer dieses Schrittes hing von der Länge des DNS-Produktes ab und errechnete sich nach dem Verhältnis: 1Kb/min, wobei 30 sec das Zeitminimum darstellten. Die Anzahl der Wiederholungen des Amplifizierungszyklus betrug 30 Zyklen. Es schloß sich der Polymerisationsschritt an, der bei 72°C ablief und 4 min andauerte. Dieser Schritt ist als Sicherheitsschritt zu verstehen, in dem die Synthese noch unvollständig hergestellter DNS-Produkte nachträglich stattfinden kann.

An die PCR schloß sich ein Mischen von jeweils 8 µl der Proben mit 4 µl Bluemarker (zum Beschweren und Sichtbarmachen) an. Danach erfolgte das Auftragen dieser Proben sowie 5µl eines 1Kb DNS-Molekulargewichtsmarkers in jeweils getrennte Bahnen auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1%-iges Gel. Die Herstellung des Gels bestand in einem Aufkochen von 100 ml TBE-Puffer mit 1g Agarosepulver sowie anschließendem Hinzufügen von 40 µl Ethidiumbromid. Anschließend blasenfreies Hineingießen in hierfür vorgesehene Gelschlitzen. Das Gel wurde mit entsprechenden Kunststoffkämme versehen, was zur Bildung von Schlitz für die betreffende Probe führte. Das Ethidiumbromid lagerte sich zwischen den Basenpaaren der DNS-Fragmente an und gewährleistete dadurch das Sichtbarwerden der durch die Elektrophorese entstandenen Banden unter UV-Licht. Das im Bluemarker enthaltene Bromphenolblau wanderte in der Elektrophorese mit der DNS und zeigte so den Fortschritt der Elektrophorese an. Das ebenfalls enthaltene Glycerin beschwerte die Proben und sorgte für ein Verbleiben der Proben in den zugehörigen Bahnen. Der Molekulargewichtsmarker war ein synthetisch hergestellter DNS-Marker, der sich in der Elektrophorese nach definierten Molekülgrößen auftrennte. Hierdurch war ein Vergleich des DNS-Produktes mit der entsprechenden Bande des Molekulargewichtsmarkers zur Erfolgskontrolle der PCR möglich (Abbildung 2 im Bildanhang).

Länge der untersuchten Gene:

<i>gyrA</i>	430 Bp
<i>gyrB</i>	495 Bp
<i>parC</i>	402 Bp
<i>parE</i>	325 Bp
<i>ermB</i>	640 Bp
<i>mefE</i>	345 Bp
<i>sulf</i> <sup>1/2</sup>	315Bp
<i>sulf</i> <sup>3/4</sup>	314Bp
<i>tri</i> <sup>1/2</sup>	883 Bp
<i>tetM</i>	850 Bp
<i>tetO</i>	1.458 kBp
<i>23S</i> 5'	1.011 Bp
<i>23S</i> 3'	1.003 Bp
<i>23S cent</i>	1.060 Bp
<i>L22</i>	420Bp
<i>L4</i>	720Bp

2.6.8 Aufreinigung

An die PCR schloß sich eine Aufreinigung an, um das gewonnene Produkt von den in der PCR hinzugefügten Substanzen wie Primer, Nukleotide, Salze, Taq-Polymerase und Öl zu befreien. Zunächst fand eine Vermischung von 300 µl PB Puffer mit dem PCR-Produkt statt, wobei eine Entfernung des Öles unterblieb. Der nächste Schritt beinhaltete das Einfüllen des entstandenen Gemisches in eine Aufreinigungssäule (*Quiaquick spin column*), die in einem 2 ml großen Sammelgefäß (*collection tube*) stand. Das anschließende Zentrifugieren bei 13.000 rpm über eine Zeit von 60 sec trennte die DNS von den überschüssigen Substanzen. Hierbei fand eine Bindung der DNS an die Membran der Säule statt, während alle anderen Substanzen in dem Sammelgefäß aufgefangen wurden. Nach dem Verwerfen des Inhaltes des Sammelgefäßes, dem Zurückstellen der Aufreinigungssäule in das geleerte Sammelgefäß und dem Einfüllen von 700 µl Waschpuffer in die Aufreinigungssäule fand ein erneutes Zentrifugieren für 60 sec statt. Nach dem erneuten Verwerfen der aufgefangenen Substanzen wurde durch weiteres Zentrifugieren von 60 sec der Waschpuffer vollständig entfernt. Das sich anschließende Eintröpfeln von 50 µl 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) in die Mitte der Membran

der Säule und das wiederholte Zentrifugieren von 60 sec diente dem Eluieren der DNS. Ein 1,5 ml Eppendorfcup fing die gereinigte DNS auf. Es schloß sich ein Auftragen von 4 µl des Eluats, vermischt mit 4 µl Bluemarker auf ein mit 40 µl Ethidiumbromid versetztes 1% Gel an. Das parallele Auftragen von jeweils 5 µl dreier Molekulargewichtsmarker, die sich in ihrer Konzentration und somit auch in ihrem DNS-Gehalt voneinander unterschieden, ermöglichte nach dem Ablauf der Elektrophorese einen Vergleich der entstandenen Banden. Ob das entstandene DNS-Produkt die geforderte Länge besaß, wurde durch Vergleich der Höhe der Banden ermittelt. Anhand des Helligkeitsvergleiches mit der 1,6 Kb-Bande konnte abgelesen werden, in welcher Konzentration das PCR-Produkt vorlag. Diese Bande wies bei dem am stärksten konzentrierten Marker einen Gehalt von 50 ng, bei einem mittelstark konzentrierten Marker einen Gehalt von 25 ng und bei einem schwach konzentrierten Marker einen Gehalt von 15 ng auf (Abbildung 3 im Bildanhang).

### 2.6.9 Sequenzierreaktion

Der Aufreinigung schloß sich die Sequenzierreaktion an. Diese erfolgte mit der von der Fa. *Applied Biosystems Inc.* (ABI PRISM) 1990 eingeführten *Taq-Cycle-Sequencing-Methode*. Das Verfahren ermöglichte durch die Anwendung der thermostabilen Taq-Polymerase eine automatische DNS-Sequenzierung in einem Thermocycler mit Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Dye Terminatoren) an der Stelle der Nukleotidmonophosphate und dem sich unmittelbar anschließenden Abbruch des DNS-Stranges (modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger). Anschließend konnte mit Hilfe des DNS-Sequenzers 377 der Fa. ABI PRISM eine elektrophoretische Analyse der auf ein Gel aufgetragenen Proben vorgenommen werden.

Der Reaktionsansatz bestand für jede einzelne Probe aus 1 µl Sequenzierprimer (Tag-Primer), 3-4 µl Premix (je nach Ansatzmenge: bei 10 µl und 15 µl Gesamtansatz 3 µl Premix, bei 20 µl Gesamtansatz 4 µl Premix), DNS-Template (die Menge, die 50 ng DNS enthielt) und dest. H<sub>2</sub>O (je nach Ansatzmenge ad 10 µl, ad 15 µl oder ad 20 µl). Während der nun folgenden Abläufe im Thermocycler erfolgte die Markierung der DNS je nach Wahl des Primers vom 3'-Ende oder vom 5'-Ende, indem die Taq-Polymerase anstelle der Nukleotidmonophosphate die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (Didesoxy A, Didesoxy C, Didesoxy G und Didesoxy T) einbaute und unmittelbar danach zum Abbruch des DNS-Stranges führte.

### Thermocycler-Protokoll (25 Zyklen)

96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min

#### 2.6.10 Fällung

Nach der Sequenzierreaktion folgte eine Fällung der DNS, die eine Aufbereitung der Proben für die Sequenzierung im Sequenzer beinhaltet. Hierzu erfolgte zunächst die Gabe von H<sub>2</sub>O (ad 100 µl) zu jeder der Proben, woran sich schließlich die Überführung dieser Proben in mit 250 µl 100%-igem Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat (ph 4,6) gefüllte Eppendorfcups anschloß. Nach einem Vermischen erfolgte ein 30 min langes Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Das Ethanol wurde anschließend mit der Pipette entfernt. Nach der Präzipitation schloß sich das Waschen mit 300 µl 70%-igem Alkohol und das anschließende Zentrifugieren über einen Zeitraum von 15 min bei 13.000 rpm an. Das Verwerfen des Alkoholüberstandes und das vollständige Trocknen (an der Luft oder 5 Min. im *Speed-Vac*) der Pellets im Eppendorfcup beendete die Fällung.

#### 2.6.11 Sequenzierung

An das Aufnehmen des getrockneten Ansatzes in 0,8 µl einer Mischung aus Formamid und EDTA/Dextranblau (50 mg/ml DB, 25 mM EDTA pH 8,0), die als Ladungspuffer dienten und ein Verhältnis von Formamid zu EDTA/DB von fünf zu eins aufwiesen, schloß sich ein Erhitzen auf 95°C für eine Zeit von 5 min zur Denaturierung an. Anschließend verblieben die Proben zur Abkühlung auf Eis. 0,7 µl der DNS-Proben wurden anschließend mit einer Pipette auf das vorbereitete Gel im DNS-Sequenzer gegeben. Bei dem zwischen zwei ca. 25 x 40 cm großen Glasplatten gegossenen Gel entstand ein ca. 0,4 mm dickes Polyacrylamidgel. Das Ansetzen der Gellösung beinhaltet das Lösen von Harnstoff (nicht über 50°C erwärmen) in einem Ansatz von 30%-iger Acrylamid-Lösung (Acrylamid: Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1), TBE-Puffer (10%) sowie H<sub>2</sub>O und das darauf folgende Filtrieren und Entgasen durch einen 0,2 µm Filter. Es folgte das Überführen in ein 150 ml Becherglas sowie ein Vermischen mit 15 µl Temed und 350 µl 10%-iger APS-Lösung zur sofortigen Polymerisation des Gels. 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 begann die Elektrophorese. Nach deren Beendigung erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Argonionenlasers. Mehrere drehbare Spiegel richteten den Laserstrahl auf das Elektrophoresegel, spezifische Linsen fokussierten den Strahl. Ein Spiegel richtete den Laserstrahl mit einem 95° Winkel auf das Gel. Mehrere spezifische Linsen sammelten die vorhandene Fluoreszenzanregung der Didesoxynukleotide und leiteten diese nach Filterung und nochmaliger Fokussierung zu einem Spektrographen. Dieser trennte das Licht nach der Wellenlänge und leitete es zu einer *Charge Coupled Device* (CCD) Camera, welche die Lichtintensität untersuchte. Die Software des angeschlossenen Computers enthielt die Informationen über die verwendeten Dye-Terminatoren und ihre Emissionsmaxima, wandelte hierdurch das Lichtsignal in ein digitales Signal um und verarbeitete es. Durch unterschiedliche Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe erschienen die vier Basen nach der graphischen Verarbeitung als grüne, blaue, rote und schwarze Wellenlinien, aus denen die Sequenz der untersuchten DNS abzulesen war. Didesoxy A erschien grün, Didesoxy C blau, Didesoxy G schwarz und Didesoxy T rot.

### 2.6.12 MHK-Bestimmung

Die MHK eines Bakteriums gab die Konzentration eines Antibiotikums an, die minimal nötig war, um das Bakterium in seinem Wachstum zu hemmen. Jeder einzelne Bakterienstamm besaß einen für ihn spezifischen MHK-Wert. Die Messung der MHK-Werte erfolgte nach dem Mikrotiterverfahren und wurde in Zweierpotenzschritten in mg/l bestimmt. Eine Übernachtskultur des zu testenden Bakterienstammes, entnommen von einer frisch bewachsenen Agarplatte, in Müller-Hinton-Medium bei 37°C führte zu einer dicht bewachsenen Bakteriensuspension. Nach der Bestimmung der optischen Dichte dieser Kultur bei 535 nm schloß sich eine Verdünnung der Suspension auf eine optische Dichte von 0,1 an und schließlich eine erneute Verdünnung mit doppeltkonzentriertem Müller-Hinton-Medium, um die Zelldichte zu verringern. Parallel erfolgte das Anlegen einer Antibiotika-Stammlösung, die das Vierfache der maximal zu testenden Antibiotikakonzentration enthielt. Zunächst erfolgte ein Einfüllen von 100 µl destilliertem und sterilisiertem Wasser in alle Löcher der 96-Loch-Mikrotiterplatten (8x12 Löcher). Die sich anschließende Antibiotikaverdünnungsreihe wurde erstellt, indem in das Loch der obersten 12er-Reihe 100

$\mu\text{l}$  der Antibiotikallösung gegeben wurden (Verdünnung 1:2). Das anschließende Mischen und Entnehmen von 100  $\mu\text{l}$  aus diesem Loch und das Einfüllen in das nächst tiefere Loch gewährleisteten eine 1:2-Verdünnung der höchsten Testkonzentration. Eine Wiederholung dieses Vorgangs fand so lange statt, bis die niedrigste zu testende Antibiotikakonzentration erreicht war. Nach Beendigung aller Antibiotikaverdünnungsreihen (für jedes Antibiotikum eine Verdünnungsreihe) erfolgte die Beimpfung mit der Bakteriensuspension, indem ein Hinzugeben von 100  $\mu\text{l}$  in jedes Loch durchgeführt wurde (nochmalige 1:2 Verdünnung). Pro Ansatz betrug die Anzahl der Bakterien ca.  $1-3 \times 10^4$  Keime/ml. Zur Qualitätskontrolle gehörten das Mitführen eines Blindwertes (ohne Antibiotikum) für jeden Stamm und jedes Antibiotikum sowie das Mitführen eines Referenzstammes pro Antibiotikum mit bekanntem MHK-Wert. Die Inkubation betrug 24 Std. bei 37°C. Anschließend wurden die optischen Dichten der einzelnen Ansätze in einem Spezialphotometer für Mikrotiterplatten bei 620 nm gemessen, um das Wachstum der Bakterien bei den unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen beurteilen zu können. Eine Bestimmung des MHK-Wertes gelang nun, indem von der niedrigsten Konzentration ausgehend eine Ermittlung derjenigen Konzentration erfolgte, bei der kein Bakterienwachstum mehr vorhanden war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Makrolide

In der vorliegenden Studie konnte mittels PCR [23, 37] bei europäischen Isolaten in 73% der untersuchten Erythromycin-resistenten Stämme (157/215) das *ermB* Gen nachgewiesen werden, während die restlichen 27% (58/215) das *mefE* Gen trugen. Alle Isolate, die *ermB* enthielten, zeigten den MLS<sub>B</sub>-Phänotyp, während die anderen Isolate nur eine Resistenz gegenüber Makroliden ausprägten. Einen Überblick hierzu liefert Tabelle 8, aus welcher sowohl die Ergebnisse der Optochin- und der Sensibilitätstestung der Isolate gegenüber Erythromycin und Clindamycin (mittels Testblättchen) als auch die Ergebnisse des PCR-Screenings auf *ermB* bzw. *mefE* abgelesen werden können (Abbildung 4 im Bildanhang). Auffällig ist nicht nur das häufigere Vorkommen von *ermB*, sondern auch die Tatsache, daß kein Isolat beide Resistenzgene gleichzeitig, also *ermB* und *mefE*, aufweist. Da bei einigen Isolaten trotz des Erythromycin-resistenten und Clindamycin-sensiblen Testblättchens keines der beiden Gene *ermB* oder *mefE* gefunden werden konnte, erweiterten wir unsere Untersuchung, um zu testen, wie viele der Isolate zusätzlich zu oder ohne *ermB* und *mefE*, Mutationen oder Veränderungen in der 23SrRNA und/oder den ribosomalen Proteinen L4 und L22 zeigten. Als Beispiel seien an dieser Stelle zwei Isolate mit der AN (=Arbeitsnummer) 121 und 377 aus Tabelle 8 erwähnt, bei denen wir weder *ermB* noch *mefE*, aber auch keine dieser Mutationen bzw. Alterationen auf Proteinebene entdecken konnten. Bei einigen Keimen (AN 5, 16, 208, 226, 231, 247, 277, 355) konnten wir anstelle von *mefE* *ermB* finden. Aber auch hier waren keine weiteren Mutationen auf ribosomaler Ebene ausgeprägt.

Die Pneumokokken wurden gemäß ihrer Empfindlichkeit gegenüber Penicillin in Penicillin-empfindliche/-sensible (PenS), Penicillin-intermediär-empfindliche (PenI) und Penicillin-resistente (PenR) *S. pneumoniae* eingeteilt. Nach erfolgtem PCR-Screening ergaben sich zwei Gruppen von *S. pneumoniae*: Isolate mit Erythromycin-resistenter-/Clindamycin-sensibler-Aktivität und Erythromycin-/Clindamycin-resistenter-Aktivität. Innerhalb der Sentry-Studie wurden die MHK-Werte der gesammelten Isolate gegenüber 30 Antibiotika getestet und durch unsere MHK-Untersuchung für Faropenem und Telithromycin ergänzt. Innerhalb dieser beiden Gruppen (EryR/ClinS; EryR/ClinR) wurde die MHK-Verteilung (Range) und der MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Wert für jedes Antibiotikum ermittelt. Der „Range“ entsprach dem jeweiligen Maximum bzw. Minimum der gemessenen MHK. Die MHK<sub>50</sub> bzw. MHK<sub>90</sub> geben die MHK an, die von mindestens 50 bzw. 90 Prozent der Isolate gerade erreicht oder

## Ergebnisse

unterschritten wird. Somit haben maximal 10% der Isolate eine MHK über der MHK<sub>90</sub> und maximal 50% eine MHK über der MHK<sub>50</sub>.

Die MHK<sub>50/90</sub>-Verteilung kann man nachfolgend der Tabelle 9 entnehmen:

**Tabelle 9:**

	Ery R, Clin S				Ery R, Clin R			
	MIC50/90	%S	Anzahl	Range	MIC50/90	%S	Anzahl	Range
Penicillin	0,06/1	53,7	82	<=0,03-2	0,25/2	30,7	166	<=0,03->4
Amoxicillin	<=0,06/2	76,8	82	<=0,06-4	0,25/2	57,8	166	<=0,06->8
Amox/Clavu	<=0,25/2	79,3	82	<=0,25-4	<=0,25/2	59,6	166	<=0,25->8
Ciprofloxacin	1,0/2	-	82	0,12->2	1,0/2	-	166	0,12->2
Levofloxacin	1,0/1,0	100	82	<=0,5-2	1,0/1,0	100	166	<=0,5-2
Sparfloxacin	0,25/0,5	100	35	<=0,12-0,5	0,25/0,5	96	50	<=0,12-1
Gatifloxacin	0,25/0,5	-	82	0,06-1	0,25/0,5	-	166	0,06-0,5
Trovafoxacin	0,12/0,25	100	82	<=0,03-0,5	0,12/0,25	100	166	<=0,03-0,5
Grepafloxacin	0,25/0,5	97,9	47	<=0,12-1	<=0,12/0,25	100	116	<=0,12-0,5
Azithromycin	2/>16	28	82	<=0,12->16	>16/>16	0	166	1->16
Clarithromycin	1/>32	23,2	82	<=0,25->32	>32/>32	1,2	166	<=0,25->32
Tetracycline	8/>16	42,7	82	<=2->16	>16/>16	17,5	166	<=2->16
Trimetho/Sulfam	<=0,25/4	68,3	82	<=0,25-8	1,0/4	45,8	166	<=0,25->8
Rifampin	<=1/<=1	100	35	<=1	<=1/<=1	100	50	<=1
Chloramphenicol	<=2/8	89	82	<=2-16	<=2/16	72,9	166	<=2->16
orale Cephalosporine								
Cefaclor	0,5/32	-	35	<=0,25->32	16/>32	-	50	<=0,25->32
Cefadroxil	2/>8	-	82	<=1->8	4/>8	-	166	<=1->8
neue								
Cefixime	0,25/>4	-	35	<=0,03->4	>4/>4	-	49	012->4
Cefpodoxime	0,06/2	-	82	<=0,03-4	0,25/2	-	166	<=0,03->4
Cefprozil	0,5/8	-	82	<=0,12->16	1,0/16	-	166	<=0,12->16
1. Generation								
2. Generation								
Cefuroxime	0,25/4	70,7	82	<=0,06-8	1,0/8	47,6	166	<=0,06-8
3. Generation								
Cefotaxime	0,06/1	87,8	82	<=0,008-2	0,12/1	69,9	166	<=0,008-2
Ceftazidime	1,0/8	-	47	<=0,25-16	2,0/16	-	116	<=0,25->16
4. Generation								
Cefepime	<=0,06/1	82,9	82	<=0,06-8	0,25/1	65,1	166	<=0,06-4
Ceftibuten	>4/>4	-	47	0,5->4	>4/>4	-	116	1->4
Loracarbef	2/>32	-	47	<=0,25->32	2/>32	-	116	<=0,25->32
Quinupr/Dalfopr	0,5/1	-	82	0,12-2	0,5/1	-	166	0,25->8
Vancomycin	0,5/0,5	98,8	82	<=0,12-2	0,5/0,5	100	166	<=0,12-1
Faropenem	0,0156/0,125	-	40	<=0,0039-0,5	0,0625/0,25	-	109	<=0,0039-0,5
Telithromycin	0,0625/0,125	-	39	<=0,0019->2	0,0313/>2	-	107	<=0,0019->2

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird, waren alle Antibiotika hoch aktiv. Im Vergleich muss den Cephalosporinen der 1.Generation (Cefadroxil und Cefaclor) mit einem  $MHK_{90}$  von 32 bzw.  $8\mu\text{g/ml}$  eine geringere Aktivität bescheinigt werden. Ebenso verhält es sich mit den beiden getesteten Makroliden Azithromycin und Clarithromycin, die einen  $MHK_{90}$  von 16 bzw.  $32\mu\text{g/ml}$  haben. Die  $MHK$ -Verteilung (Tabelle 3) ergibt, daß etwa 20% der Pneumokokken Makrolid-resistent sind. Die höchste Aktivität zeigen Faropenem und Telithromycin (jeweils  $MHK_{90}$   $0,125\mu\text{g/ml}$ ), gefolgt von Trovafloxacin ( $MHK_{90}$   $0,25\mu\text{g/ml}$ ) und Gatifloxacin ( $MHK_{90}$   $0,5\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.2 Tetrazykline

Die in die Sentry-Studie eingeschleusten 240 Tetrazyklin-resistenten Isolate wurden ebenso wie die Makrolide auf ihre  $MHK$ -Werte gegenüber 30 Antibiotika getestet. Der Datensatz wurde durch unsere  $MHK$ -Untersuchung mit Faropenem und Telithromycin ergänzt (Tabelle 3). Die Keime wurden zuvor als Optochin-sensibele Pneumokokken (Testblättchen) identifiziert und anschließend in Doxycyclin-sensible, Doxycyclin-intermediäre und Doxycyclin-resistente Isolate eingeteilt. Für das weitere Screening auf *tetM* bzw. *tetO* wurden alle Isolate mit einer  $MHK \geq 4\mu\text{g/ml}$  in unsere Untersuchung eingeschleust. In den untersuchten 240 Tetrazyklin-resistenten Isolaten konnten wir mittels PCR nur *tetM*, nicht jedoch *tetO* detektieren (Abbildung 5 im Bildanhang).

Die  $MHK_{50/90}$ -Bestimmung zeigt Tabelle 10: Die höchste Aktivität gegen Tetrazyklin-resistente Pneumokokken zeigen Faropenem, Trovafloxacin und Grepafloxacin (je  $MHK_{90}$   $0,25\mu\text{g/ml}$ ), ebenso Telithromycin und Vancomycin (je  $MHK_{90}$   $0,5\mu\text{g/ml}$ ), gefolgt von Cefotaxim und Cefepim (je  $MHK_{90}$   $1,0\mu\text{g/ml}$ ). Die Makrolide Azithromycin, Clarithromycin und Erythromycin schneiden mit  $MHK_{90}$  von  $>16$  bzw.  $>32\mu\text{g/ml}$  weniger aktiv ab.

**Tabelle 10:**

	<b>tet R</b>			
	MIC50/90	%S	Anzahl	Range
Penicillin	0,12/2	48,6	290	$\leq 0,03-4$
Amoxycillin	$\leq 0,06/2$	71	290	$\leq 0,06 \rightarrow 8$
Amox/Clavu	$\leq 0,25/2$	72,1	290	$\leq 0,25 \rightarrow 8$
Ciprofloxacin	1,0/2	-	290	$0,12 \rightarrow 2$
Levofloxacin	1,0/1	99,3	290	$\leq 0,5-4$
Sparfloxacin	0,25/0,5	97,5	119	$\leq 0,12-1$
Gatifloxacin	0,25/0,5	-	290	$0,06-2$
Trovafloxacin	$\leq 0,12/0,25$	100	290	$\leq 0,03-1$
Grepafloxacin	0,12/0,25	100	171	$\leq 0,12-1$

## Ergebnisse

Erythromycin	2/>32	36,6	290	<=0,25->32
Clindamycin	0,25/>8	51,7	290	<=0,06->8
Azithromycin	8/>16	40,7	290	<=0,12->16
Clarithromycin	2/>32	41	290	<=0,25->32
Trimeth/Sulfam	0,5/4	54,1	290	<=0,25->8
Rifampin	<=1/<=1	100	119	<=1
Chloramphen.	<=2/16	74,1	290	<=2->16
orale Cephalosporine				
Cefaclor	1/>32	-	119	<=0,25->32
Cefadroxil	4/>8	-	290	<=1->8
neue				
Cefixime	1/>4	-	118	<=0,03->4
Cefpodoxime	0,06/2	-	290	<=0,03->4
Cefprozil	0,5/16	-	290	<=0,12->16
1.Generation				
2. Generation				
Cefuroxime	0,25/4	61,7	290	<=0,06-8
3. Generation				
Cefotaxime	0,06/1	79,7	290	<=0,008-2
Ceftazidime	1,0/16	-	171	<=0,25-32
4. Generation				
Cefepime	0,12/1	75,9	290	<=0,06-8
Ceftibuten	>4/>4	-	171	0,5->4
Loracarbef	2/>32	-	171	<=0,25->32
Quinupr/Dalfopr	0,5/1	-	290	<=0,06-2
Vancomycin	0,5/0,5	99,7	290	<=0,12-2
Faropenem	0,0156/0,25	-	170	<=0,0039-0,5
Telithromycin	0,0156/0,5	-	169	<=0,0019->2

### 3.3 Chinolone

Wenn man den von Chen [75] festgelegten Wert von  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  für Ciprofloxacin zugrundelegt, zeigen bei MHK-Bestimmung 1,8% (21/1191) eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin. Tabelle 3 zeigt die Verteilung der MHK-Werte.

In der vorliegenden Studie wurden die vier Isolate mit einem Levofloxacin MHK-Wert von  $1\mu\text{g}$  bis  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  mittels PCR amplifiziert und sequenziert und die klassischen Alterationen an den „hot spots“ gefunden, nämlich Ser81Phe oder Tyr in *gyrA* und Ser79Phe und Asp83Asn in *parC* (Tabelle 11 und Abbildung 6 im Bildanhang).

**Tabelle 11:**

Isolat	Gen	MHK	Mutation	Aminosäure
25P13B152	<i>gyrA</i>	2µg/ml	224C→T	75Tyr→Tyr
78P13B132	<i>gyrA</i>	>4µg/ml	224C→T	75Tyr→Tyr
115P13B138	<i>gyrA</i>	2µg/ml	224C→T	75Tyr→Tyr
250P06B158	<i>gyrA</i>	1µg/ml	224C→T	75Tyr→Tyr
25P13B152	<i>parC</i>	2µg/ml	236C→ T	79Ser→ Phe
78P13B132	<i>parC</i>	>4µg/ml	247G→ A	88Asp→ Asn
			384C→ T	Stille Mutation
			411G→ T	Lys →Asn
115P13B138	<i>parC</i>	2µg/ml	236C→ T	79Ser→ Phe
250P06B158	<i>parC</i>	1µg/ml	236C→ T	79Ser→ Phe

Untenstehende Tabelle 12 liefert die MHK<sub>50/90</sub>-Werte und die Maxima bzw. Minima der einzelnen MHK-Werte für Ciprofloxacin (=Cip)-resistente *S.pneumoniae* mit MHK  $\geq 2\mu\text{g/ml}$  für insgesamt 30 Antibiotika.

**Tabelle 12:**

	Cip >2µg/ml			
	MIC50/90	%S	Anzahl	Range
Penicillin	$\leq 0,03/2$	56,3	16	$\leq 0,03-2$
Amoxicillin	$\leq 0,06/2$	81,3	16	$\leq 0,06-8$
Amox/Clavu	$0,25/2$	81,3	16	$\leq 0,06-4$
Levofloxacin	$2,0/4$	87,5	16	$1->4$
Sparfloxacin	$0,5/1$	80	5	$0,25-1$
Gatifloxacin	$0,5/1$	-	16	$0,25->4$
Trovafloxacin	$0,25/0,5$	93,8	16	$0,06-4$
Grepafloxacin	$0,5/1$	63,6	11	$\leq 0,12->1$
Erythromycin	$1/>32$	43,8	16	$\leq 0,25->32$
Clindamycin	$\leq 0,06/>8$	62,5	16	$\leq 0,06->8$
Azithromycin	$1/>16$	43,8	16	$\leq 0,12->16$
Clarithromycin	$1/>32$	37,5	16	$\leq 0,25->32$
Tetracycline	$\leq 2/>16$	56,3	16	$\leq 2->16$
Trimeth/Sulfam	$2,0/4$	43,8	16	$\leq 0,25-4$
Rifampin	$\leq 1/\leq 1$	100	5	$\leq 1$
Chloramphenicol	$2,0/8$	87,5	16	$2,0-16$
orale Cephalosporine				
Cefaclor	$8,0/32$	-	5	$\leq 0,25-32$
Cefadroxil	$4/>8$	-	16	$\leq 1->8$
neue				

## Ergebnisse

Cefixime	>4/>4	-	5	0,25->4
Cefpodoxime	0,06/2	-	16	<=0,03-2
Cefprozil	0,5/16	-	16	<=0,12-16
1.Generation				
2. Generation				
Cefuroxime	0,25/4	62,5	16	<=0,06-4
3. Generation				
Cefotaxime	0,06/1	87,5	16	<=0,008-1
Ceftazidime	1,0/8	-	11	<=0,25-16
4. Generation				
Cefepime	0,12/1	81,3	16	<=0,06-1
Ceftibuten	>4/>4	-	11	1->4
Loracarbef	1,0/32	-	11	0,5->32
Quinupr/Dalfopr	0,5/1	-	16	0,12-2
Vancomycin	0,5/1	100	16	0,25-1
Faropenem	0,0078/0,0625	-	5	<=0,0039-0,0625
Telithromycin	<=0,0019/0,0313	-	5	<=0,0019-0,0313

Faropenem und Telithromycin zeigen mit ihren MHK<sub>90</sub>-Werten (0,0625/0,0313µg/ml) eine hohe Aktivität gegenüber Ciprofloxacin-resistente Pneumokokken. Nicht dagegen die Makrolide Erythromycin, Azithromycin, Clindamycin und Clarithromycin, bei denen die MHK<sub>90</sub>-Werte von >8µg bis >32µg variieren. Den oralen Cephalosporinen Cefaclor und Cefadroxil muß ebenfalls eine geringe Aktivität mit MHK<sub>90</sub> von 32µg bis >8µg attestiert werden.

### 3.4 Trimethoprim/Sulfamethoxazol

In der vorliegenden Studie zeigte die MHK-Bestimmung, daß 12,4% der Isolate resistent gegen Cotrimoxazol waren. Die Verteilung der MHK-Werte ist in Tabelle 3 dargestellt. Zur Klärung der Resistenzmechanismen haben wir 50 Isolate willkürlich ausgewählt, die sowohl gegenüber Trimethoprim als auch gegenüber Sulfamethoxazol resistent waren. Das DHFR Gen wurde mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Abbildung 7), und wie erwartet ließ sich bei allen getesteten Isolaten eine Ile100Leu Alteration beobachten (Tabelle 13C). Ein weiteres PCR-Screening sollte die Ursachen der Resistenz untersuchen. In unserer Studie besaßen alle 50 Isolate eine Baseninsertion GAA kombiniert mit AGC oder AGT alleine zwischen Codon 61 und 62, AGT kombiniert mit AGC als auch AAC oder AGT alleine zwischen Codon 62 und 63, und AGC kombiniert mit TAT zwischen Codon 63 und 64. Während der Rest der Insertionen schon als Duplikationen beschrieben wurden, die zur Wiederholung von ein oder

zwei Aminosäuren in der Codonstruktur führen, sind die beobachteten AAC und GAA Insertionen hier zum ersten mal beschrieben worden und können den Tabellen 13 A und B entnommen werden. Diese stellen keine Duplikationen von schon existierenden Sequenzen in der *sulA* Region dar.

Die in der Literatur beschriebene Kreuzresistenz von Penicillin und Cotrimoxazol spiegelt sich in den  $MHK_{50/90}$ -Werten für Cotrimoxazol-resistente Pneumokokken wider (Tabelle 14): Amoxicillin und Amoxicillin/Clavulansäure mit  $MHK_{90}$  4 $\mu$ g/ml und Penicillin mit  $MHK_{90}$  2 $\mu$ g/ml.

**Tabelle 14:**

$MHK_{50/90}$  Auswertung für Sulfamethoxazol (=SXT)-resistente Pneumokokken

	SXT R			
	MIC50/90	%S	Anzahl	Range
Penicillin	0,5/2	30,3	228	<=0,03->4
Amoxicillin	0,5/4	53,1	228	<=0,06->8
Amox/clavunilate	0,5/4	53,5	228	<=0,25->8
Ciprofloxacin	1.0/2	-	228	0,06->2
Levofloxacin	1.0/1	100	228	<=0,5-2
Sparfloxacin	0,25/0,5	96,8	94	<=0,12-1
Gatifloxacin	0,25/0,5	-	228	0,06-1
Trovafloxacin	0,12/0,5	100	228	<=0,03-0,5
Grepafloxacin	<=0,12/0,25	99,3	134	<=0,12-1
Erythromycin	0,5/32	49,1	228	<=0,25->32
Clindamycin	<=0,06/>8	59,6	228	<=0,06->8
Azithromycin	0,5/>16	52,6	228	<=0,12/>16
Clarithromycin	<=0,25/>32	52,6	228	<=0,25->32
Tetracycline	16/>16	41,7	228	<=2->16
Rifampin	<=1/<=1	100	94	<=1
Chloramphenicol	<=2/16	65,8	228	<=2->16
orale Cephalosporine				
Cefaclor	16/>32	-	94	<=0,25->32
Cefadroxil	>8/>8	-	228	<=1->8
neue				
Cefixime	>4/>4	-	94	<=0,03->4
Cefpodoxime	1,0/2	-	228	<=0,03->4
Cefprozil	4,0/16	-	228	<=0,12->16
1.Generation				
2. Generation				
Cefuroxime	2,0/8	38,6	228	<=0,06->8
3. Generation				
Cefotaxime	0,25/1	68,9	228	<=0,008-4

## Ergebnisse

Ceftazidime	4,0/16	-	134	$\leq 0,25-32$
4. Generation				
Cefepime	0,5/2	61	228	$\leq 0,06-8$
Ceftibuten	$>4/>4$	-	134	$1->4$
Loracarbef	$32/>32$	-	134	$\leq 0,25->32$
Quinupr/Dalfopr	0,5/1	-	228	$0,12->8 (2)$
Vancomycin	0,5/0,5	99,6	228	$\leq 0,12-2$
Faropenem	0,125/0,25	-	154	$\leq 0,0039-0,5$
Telithromycin	0,0156/0,125	-	152	$\leq 0,0019->2$

### 3.5 $\beta$ -Laktame

Die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika wird bei *S. pneumoniae* durch veränderte Penicillin-Binde-Proteine (PBP) verursacht. Aus der Klasse der  $\beta$ -Laktamantibiotika wurden stellvertretend für die Penicilline die MHK-Werte gegenüber Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Penicillin G ermittelt. Vertreter der Cephalosporine waren Cefadroxil, Cefaclor, Ceftibuten, Cefprozil, Cefuroxim, Cefixim, Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidime, Cefepim und Loracarbef. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Verteilung der MHK-Werte für die verschiedenen  $\beta$ -Laktamantibiotika. 72,9% der Isolate waren Penicillin empfindlich, 19,9% waren intermediär resistent und 7,2% zeigten eine Penicillinresistenz. Dabei waren 5% der Blutkulturisolate resistent, während 7% der Isolate von ambulant erworbenen Pneumonien und 11% der Isolate aus nosokomialen Pneumonien eine Resistenz gegen Penicillin zeigten.

Obwohl Amoxicillin und Amoxicillin/Clavulansäure die gleiche oder eine halb so große Aktivität, relativ zum Gewicht, gegen Pneumokokken zeigen, wie Penicillin G, sind die Resistenzraten weitaus niedriger. Dies ist aber eine Folge der verschiedenen MHK-Grenzwerte. Die Aktivitäten der Cephalosporine variierten je nach Höhe der Penicillinresistenz. Insgesamt zeigte Cefotaxim die höchste *in-vitro* Aktivität, es folgten Cefepim, Cefpodoxim, Cefuroxim, Cefprozil und Cefixim, Cefaclor und mit der geringsten Aktivität Cefadroxil. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Verteilung der MHK-Werte für die verschiedenen  $\beta$ -Laktamantibiotika.

Es gab ein auffälliges Verhältnis zwischen Penicillinresistenz und Erythromycinresistenz (19% aller Isolate), gegenüber Penicillin- und Clindamycinresistenz (14%) und gegenüber

Penicillin- und Tetrazyklinresistenz (23%). Nur ein einziges Isolat zeigte eine Levofloxacinresistenz (Tabelle 4).

#### 4 Diskussion

*Streptococcus pneumoniae* ist ein weit verbreiteter Krankheitserreger. Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegenüber Penicillin G sowie gegenüber anderen Antibiotika ist neben dem rationalen Einsatz der Antibiotika auch die Entwicklung neuer Substanzen gefragt. Zusätzlich zum vermehrten Auftreten einer  $\beta$ -Laktamantibiotika-Resistenz werden zunehmend Isolate mit einer Resistenz gegenüber Makroliden, Tetrazyklinen, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Chinolonen beobachtet. Die besorgniserregende Zunahme der (Multi-)Resistenz wurde in zahlreichen Studien belegt [97, 98]. In der vorliegenden Studie wurde die Empfindlichkeit von 1191 klinischen *S. pneumoniae*-Isolaten gegenüber 32 Antibiotika getestet. Die Erythromycin-, Tetrazyklin-, Chinolon- und Sulfamethoxazol-resistenten Stämme wurden weiter auf Phänotyp und genetische Marker untersucht. Die 1191 Isolate stammten aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des *SENTRY*-Überwachungsprogramms gesammelt wurden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue und bekannte Resistenzmechanismen zu finden und anhand der gewonnenen Ergebnisse, Definitionen auf Basis genetischer Untersuchungen abzuleiten.

Keime mit Problemresistenzen sind bereits seit einiger Zeit bekannt. Im Jahre 1940 beschrieben Abraham und Chain ein penicillinhydrolysierendes Enzym bei *E. coli* [99, 100], 1944 entdeckte Kirby eine ähnliche Penicillinase bei *Staphylococcus aureus* [101]. Hinzu kamen einige Jahre später multiresistente Krankheitserreger, welche die therapeutische Wahl bei der Behandlung noch stärker einengten. Seit den 70er Jahren wird das Auftreten Penicillin-resistenter Pneumokokken beobachtet. Von einer Penicillin-Resistenz bei Pneumokokken wurde dann erstmals 1965 von Kislak et al. in Boston berichtet und dann zwischen 1974 und 1984 weltweit beschrieben [102]. Zu den in neuester Zeit erkannten Problemkeimen gehören penicillinresistente Pneumokokken, welche zuerst 1967 in Australien entdeckt und in einer multiresistenten Form 1977 in Südafrika bei Minenarbeitern gefunden wurden [103]. Bei diesen Pneumokokken handelte es sich erstmals um multiresistente Stämme, die gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent waren. Schon Ende der 80er Jahre wurde die Penicillin-Resistenz von Pneumokokken ein Problem von internationaler Bedeutung.

Überwachungsprogramme der WHO (World Health Organization) und der IFAR (International Forum for Antibiotic Resistance) haben zu der Resistenzproblematik Stellung genommen und ein „Strategiepapier“ (WHO), welches im September 2001 veröffentlicht wurde, und ein „Global White Paper“ (IFAR) formuliert. Das „Strategiepapier“ beinhaltet

einen Katalog für Interventionsmaßnahmen, das „Global White Paper“ enthält Strategien zur internationalen Aktion gegenüber Antibiotikaresistenz bei Erregern der Atemwegsinfektionen. Vor allem in Ungarn, Frankreich und Spanien besteht eine sehr hohe Antibiotikaresistenz [104, 105]. In Deutschland sind aktuellen Studien zufolge 28 Prozent der Pneumokokken Makrolidresistent. Tendenz steigend [106, 107]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch innerhalb unserer Studie, in der 19,4% der Isolate als Erythromycin-resistent und 14,3% als Clarithromycin-resistent getestet wurden. Die Situation der Penicillin-Resistenz bei invasiven Pneumokokken-Erkrankungen ist in Deutschland laut aktueller Studien mit 5 bis 10 Prozent noch recht günstig [107]. Diese Zahlen decken sich in etwa mit denen unserer Untersuchung, bei der wir 72,9% der Isolate Penicillin-empfindlich, 19,9% Penicillin-intermediär und 7,2% Penicillin-resistent testeten (Tabelle 3). Betrachtet man allerdings die zeitliche Komponente der Resistenzentwicklung, so war in den letzten Jahren eine deutliche Zunahme der Penicillinresistenz zu verzeichnen [107]. Diesen Sachverhalt belegen Mason et al. in ihrer Arbeit, in der sie neben der Untersuchung von 4489 Isolaten zusätzlich zur zeitlichen Komponente auch auf geographische Unterschiede der Resistenzlage hinweisen. Hiernach hat sich sowohl die Anzahl der Penicillin-intermediären als auch die Anzahl der Penicillin-resistenten Isolate von 1992 (I=15%, R=7%) bis 1997 (I=23,6%, R= 12,9%) fast verdoppelt [108]. Die aktuelle *PROTEKT* (Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology of the Ketolide Telithromycin) Studie stellte im Jahr 2002 in Frankfurt ihre Ergebnisse vor und sprach von einer „Aufrüstung der Pneumokokken in Europa“. Europaweit soll die Penicillinresistenz der Pneumokokken die 20-Prozent-Marke überschritten haben, wohingegen die Makrolidresistenz bei über 25 Prozent liegt. Die zeitliche Brisanz der Penicillin-Resistenzentwicklung – wie sie oben von Mason bereits zitiert wurde – ist auch Inhalt dieser *PROTEKT*-Studie [107]. Bestätigt werden hier auch die dramatischen Zahlen der Resistenzen aus Frankreich (46%) und Spanien (42%). In Deutschland sei die Makrolidresistenz besorgniserregender (28%) als die Penicillinresistenz (7%).

Die Weltgesundheitsorganisation WHO hatte im September 2001 vor der weltweiten Zunahme der Antibiotika-Resistenz gewarnt. Pneumokokken seien der weltweit bedeutendste bakterielle Krankheitserreger. Insgesamt kommt es zu etwa 12.000 Todesfällen in Deutschland. Ältere Menschen sind besonders gefährdet, da 90 Prozent der Opfer älter als 60 Jahre sind. Weltweit werden immer mehr Bakterienstämme gegen Antibiotika resistent. Einer neuen Studie zufolge (Alexander-Projekt) gilt dies vor allem für Pneumokokken, die wichtigsten Erreger der Lungenentzündung. Bedenklich äußerten sich die Teilnehmer dieser Studie über die Resistenzlage der Pneumokokken insbesondere in Japan, Hongkong,

Singapur, Südafrika, Mexiko und den USA, wo teilweise 70 Prozent der Pneumokokken gegen Penicillin resistent seien [109]. Ebenso bedenklich sei die Lage in Spanien und Frankreich mit 45% resistenten Pneumokokken [110]. Positiver scheinen auch hier laut Alexander-Projekt die Zahlen für Deutschland zu sein, wo lediglich 7 bis 8% der Pneumokokken resistent zu sein scheinen. Gesammelt wurden die Daten im Jahre 2000. Die Testung der Isolate, die aus 23 verschiedenen Ländern stammten, erfolgte gegenüber 25 Antibiotika (Alexander der Große, der an einem fieberhaften Infekt gestorben sein soll, gab dem Projekt seinen Namen). Betrachtet man die unterschiedlichen Daten der Resistenzen (USA 70%, Frankreich und Spanien 45%, Deutschland 8%), so scheint es deutliche regionale Unterschiede zu geben. Ziel unserer Studie war es, die Genetik und die Resistenzmechanismen bei Pneumokokken mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Makroliden und Tetrazyklinen zu untersuchen und Definitionen für das Resistenzverhalten zu finden. Was sind die Gründe der Resistenzentwicklung? Die Resistenzentwicklung wird durch zwei Hauptkomponenten bestimmt. Dem genetischen Potential zur Resistenzentwicklung und dem Selektionsdruck durch therapeutischen Antibiotikaeinsatz. Gut belegt ist die Resistenzentwicklung infolge des Selektionsdruckes wie z.B. die Makrolidresistenz im Zusammenhang mit der Makrolidtherapie der Acne [111]. Bestätigt wird diese Theorie durch das Fehlen der Resistenz gegenüber Chinolonen bei MRSA aus Polen, wo Fluorchinolone nicht zugelassen waren [112]. Allerdings finden sich auch Beispiele für einen Rückgang der Resistenz-Inzidenz. In Finnland stieg die Erythromycinresistenz bei *S. pyogenes* mit der zunehmenden ambulanten Verschreibung von Erythromycin im Jahre 1990 zunächst auf 13% an, ehe die Resistenzhäufigkeit durch einen zurückhaltendem Einsatz dieses Antibiotikums wieder zurück ging [113].

Der grundsätzliche Trend der Multiresistenz scheint sich auch in der Schweiz abzuzeichnen. Eine für die ganze Schweiz repräsentative Untersuchung von nasopharyngealen Pneumokokkenisolaten von Kindern mit akuter Otitis media oder Pneumonie in der ambulanten Praxis über den Zeitraum von zwei Jahren (1998 und 1999) zeigt, daß sich die Resistenzlage in der Schweiz rasch und drastisch verändert. Im Moment sind hauptsächlich die Westschweiz und vor allem Kinder unter zwei Jahren betroffen. Etwa 20% der Pneumokokkenisolate sind gegen Penicillin vermindert empfindlich (übrige Regionen noch unter 10%), bei Kindern unter zwei Jahren fast ein Drittel [114].

In einer prospektiven Kohortenstudie in der australischen Hauptstadt Canberra fand man heraus, daß mit jedem zusätzlichen Tag einer Antibiotikagabe das Risiko einer Resistenzentwicklung für Pneumokokken um 4% anstieg. Die Autoren schließen aus diesen

Ergebnissen, daß die Neigung zur Ausbreitung resistenter Pneumokokken sinken könnte, wenn weniger Antibiotika verordnet würden [115]. Auch die *PROTEKT*-Studie verlangt nach einem restriktiven Antibiotikaeinsatz und die Entwicklung neuer Substanzen, da die derzeitige Behandlung gegen resistente Keime nicht effektiv sei [107].

In einer weiteren Studie aus Österreich wurden – beginnend im Jahre 1994 – Linzer Pneumokokken-Stämme auf ihre genetischen Determinanten ihrer Resistenz und ihren Phänotyp hin untersucht. In diese Studie wurden weitere Ergebnisse aus Untersuchungen von 1999 und 2000 aus verschiedenen Regionen Österreichs eingeflochten. Die Prävalenz der Penicillin-, Erythromycin- und Tetrazyklin-Resistenz betrug für Linz 3 bzw. 12 und 11 Prozent. Bei allen Stämmen, die im Jahr 1999 in Linz isoliert wurden, betrug die Prävalenz der Erythromycin-Resistenz 16% und die der Tetrazyklin-Resistenz 13%. Fenoll et al. und Baquero et al. prophezeiten [78, 116] für Spanien einen Anstieg der Erythromycin-Resistenz (Spanien 1989: 10%, 1997: 33,7%), ebenso taten es Marchese et al. für Italien (1993: 6%, 1999: 31,7%) [117]. Vergleicht man die Erythromycin-Resistenz aus Spanien und Frankreich mit den aktuellen Zahlen unserer und mit denen anderer Studien, so liegt die Erythromycin-Resistenz für Pneumokokken in Deutschland im Gegensatz zu Spanien mit 20% noch unter der 30-Prozent Marke. Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung wird es aber wahrscheinlich auch in Deutschland bzw. in den anderen Ländern in Zukunft zu einem Anstieg der Erythromycin-resistenten Pneumokokken kommen, solange der Antibiotikaeinsatz nicht gezügelt werden kann. Unsere ermittelte Penicillin-Resistenz mit 7,2% deckt sich mit der in der Protekt- bzw. Alexander-Studie gemachten Angabe. Die Penicillinresistenz scheint demnach in Deutschland und in den übrigen Ländern zwar noch von geringer Bedeutung zu sein. Hinsichtlich der bereits erwähnten zeitlichen Brisanz der Resistenzzunahme wird es in Zukunft dennoch von entscheidender Bedeutung sein, die Penicillin- bzw. Tetrazyklin-Resistenz (19,4%) in weiterführenden Studien zu verfolgen.

Die Makrolid-Resistenz bei Streptokokken beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen. Zum einen auf einer enzymatischen Veränderung des Angriffspunkts an den Ribosomen, die von einem *erm*-Gen kodiert wird. Solche Stämme sind resistent gegenüber allen Makroliden und auch gegenüber Lincosamiden und Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>-Resistenz) [42].

Zum anderen auf dem Transport des Makrolids aus der Zelle. Dieser Transportmechanismus wird von einem *mef*-Gen gesteuert [21, 22]. und betrifft nur 14- und 15-gliedrige Makrolide, nicht aber 16-gliedrige Makrolide wie Josamycin. Das *mef*-Gen führt nur zu einer Makrolid-Resistenz (M-Resistenz). Ein neues *erm*-Gen, genannt *ermTR*, wurde von Seppälä et al. 1998 bei *S. pyogenes* beschrieben [118]. 2001 fanden Syrogyannopoulos et al. [45] auch bei *S.*

*pneumoniae* ein *ermTR*-Gen. Dies war allerdings nicht Inhalt unserer Arbeit. Bei Pneumokokken wurden auch andere Makrolid-Resistenz-Mechanismen beschrieben, die aber viel seltener vorkommen: Makrolid-Esterase, Makrolid-Phosphorylase, Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie Mutationen in der ribosomalen 23 S rRNA [23]. Keine dieser Mutationen in den ribosomalen Proteinen konnten wir entdecken, so daß es sich offenbar zurzeit immer noch um sehr seltene Veränderungen, primär bei Isolaten aus Osteuropa, handeln dürfte. Weltweit wurde bei *S. pneumoniae* eine Penicillin- und Clarithromycin-Resistenz von 54,1% und 67,9% in Japan, 16,9% und 74,2% in China, 10,7% und 8,7% in England, 7,8% und 9,9% in Deutschland, 65,6% und 37,8% in Spanien, 66,5% und 58,4% in Frankreich, 16,8% und 24,3% in Italien festgestellt [105]. Felmingham et al. fanden in den Untersuchungen des Alexander-Projekts 1992 -1996 in Frankreich und Italien – Länder mit hoher Verwendung von Makrolid-Antibiotika – eine höhere, nicht mit einer Penicillin-Resistenz assoziierte Makrolid-Resistenz [84]. Dies stand im Gegensatz zu den meisten anderen Ländern, wo eine Makrolid-Resistenz stets mit einer Penicillin-Resistenz assoziiert war. Die gekoppelte Makrolid-Resistenz bei Penicillin-resistenten Pneumokokken wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [119]. Die Analyse unserer Daten ergab ähnliche Hinweise. So lag die Rate der Erythromycin-Resistenz für Penicillin-empfindliche Stämme nur bei ca 10%, während sie bei intermediär-resistenten Stämmen auf 40% und für resistente Isolate sogar auf 55% anstieg. Es scheint demnach eine Kreuzresistenz zwischen Erythromycin- und Penicillin-Resistenz zu geben. Für alle Isolate konnten wir eine fast vollständige Kreuzresistenz zwischen den drei Makroliden finden. So waren 98,1% der Erythromycin-resistenten Isolate ebenfalls resistent gegenüber Clarithromycin und Azithromycin. Penicillin-empfindliche Isolate waren zu 6,5% gegenüber Clindamycin resistent, während die Penicillin-resistenten Isolate zu 49,4% eine Kreuzresistenz gegenüber Clindamycin aufwiesen. Ähnliche Zusammenhänge konnten wir auch bei Chloramphenicol, gegen das 3,1% der Penicillin-empfindlichen Isolate und 42,5% der resistenten Isolate resistent waren, sowie bei Tetracyklinen, 16,1% versus 51,7%, beobachten. Auch bei Cotrimoxazol stieg die prozentuale Resistenz von 4,8% bei Penicillin-empfindlichen Stämmen auf 49,4% bei resistenten Isolaten an. Eine Übersicht gibt hierzu Tabelle 4. Man kann demnach davon ausgehen, daß eine Resistenz gegenüber einem bestimmten Antibiotikum die Gefahr der Muliresistenz beinhaltet, was dann wiederum therapeutische Konsequenzen verlangt.

Eine Dominanz der MLS<sub>B</sub>-Phänotypen und der *erm*-Gene wurde aus Spanien [78], Italien [117] und Belgien [120] berichtet, im Gegensatz zu den USA [121] und Kanada [122], wo

das *mef*-Gen eine weitere Verbreitung hat. In der vorliegenden Studie konnten wir bei europäischen Isolaten in 73% der untersuchten Erythromycin-resistenten Stämme (157/215) das *ermB*-Gen nachweisen, während die restlichen 27% (58/215) das *mefE* Gen trugen. Alle Isolate, die das *ermB*-Gen enthielten, zeigten den MLS<sub>B</sub>-Phänotyp, während die anderen Isolate nur eine Resistenz gegenüber Makroliden ausprägten. Gründe für die unterschiedliche Dominanz der beiden Gene *ermB* und *mefE* liegen vermutlich in regionalen Unterschieden. In den USA, Südafrika und Kanada wurde von einer Zunahme *mefE* tragender Pneumokokken berichtet [40, 122]. Dabei soll sich die Zahl der Pneumokokken mit *mefE* zwischen 1994 und 1999 sogar verdreifacht haben [1]. Der Mechanismus, der sich hinter dieser schnellen Zunahme von *mefE* verbirgt, ist noch ungeklärt. Es wird diskutiert, daß die klonale Ausbreitung und globale Verbreitung der Multiresistenz bei der Zunahme von *mefE* eine Rolle spielen. Die interkontinentale Ausbreitung der multiresistenten Klone wurde bereits mehrfach dokumentiert [123-125]. So wurde kürzlich von der Ausbreitung des Makrolid-resistenten Seotyp-14-Klons von Schweden nach Australien berichtet [126]. Es wäre demnach hypothetisch möglich, daß aufgrund klonaler Ausbreitung auch in Europa eine Zunahme des *mefE* Gens zu verzeichnen sein könnte. Dieser Sachverhalt müßte dann in Zukunft in großen Studien untersucht werden.

Das in der Literatur beschriebene *tetO*-Gen ist in europäischen Isolaten offensichtlich wenig verbreitet. In den von uns untersuchten 240 Tetrazyklin-resistenten Isolaten konnten wir nur *tetM* detektieren, so daß das *tetO*-Gen zurzeit vermutlich keine klinische Bedeutung hat oder noch nicht sicher in Zusammenhang mit einer Tetrazyklin-Resistenz gebracht werden kann. Eine weitere mögliche Erklärung für die Dominanz des *tetM* Gens wäre das gemeinsame Vorkommen der beiden Gene *ermB* und *tetM* auf demselben Transposon Tn 1545 [22, 127].

Die zunehmende Kreuzresistenz von Penicillin- und Erythromycin-Resistenz hat dazu geführt, daß man bei der Behandlung von Pneumokokken auf andere Substanzen ausweichen muß. Hierbei sollten einige neue Anforderungen erfüllt werden. Die neue Substanz sollte möglichst alle wichtigen Erreger (auch atypische) erfassen, sie sollte aktiv sein gegen Makrolid- und  $\beta$ -Laktam-resistente Erreger, sie sollte ein geringes Potential zur Induktion und Selektion von Resistenzen haben und möglichst wenig Kreuzresistenzen aufweisen. Daten der Pharmakologie belegen, daß das neue Antibiotikum Telithromycin (Ketek®) diese Anforderungen erfüllt [107]. Es besteht – wie Erythromycin – aus einem 14-gliedrigen Lactonring, neuen Carbamat-Seitenketten und einer Ketogruppe. Die Carbamat-Seitenkette ermöglicht eine höhere Penetration in die Zelle und somit eine stärkere Anreicherung der Substanz in den Zellen. Die Ketogruppe ersetzt die sonst übliche Cladinose-Seitenkette der

Makrolide und schützt so vor einer Makrolidresistenz. Die Induktion von Resistenzen wird auch dadurch verhindert, daß das Ketolid nicht nur an der Domain V der 23S rRNA, sondern auch an der Domain II bindet und somit eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlicher macht, da das Bakterium an beiden Stellen gleichzeitig mutieren müßte, um resistent zu werden. In der vorliegenden Studie haben wir die MHK-Werte der Erythromycin-resistenten Stämme für Telithromycin getestet.

Der „Range“ der MHK-Werte der Erythromycin-resistenten (EryR) und Clindamycin-sensiblen (ClinS) Isolate lag für Telithromycin bei 0,0019 µg/ml bis >2 µg/ml, wobei die MHK<sub>90</sub> mit 0,125 µg/ml eine gute Wirksamkeit zeigte. Für EryR- und ClinR-Isolate konnten ähnliche Bereichsgrenzen von 0,0019 µg/ml bis >2 µg/ml zugrunde gelegt werden. Die MHK<sub>90</sub> zeigte allerdings mit >2 µg/ml für EryR/ClinR eine schwächere Wirksamkeit der Substanz. Insgesamt bestätigen unsere Ergebnisse für Telithromycin eine vielversprechende Wirksamkeit (MHK<sub>90</sub> 0,125 µg/ml), da die anderen üblichen Substanzen wie z.B. Amoxicillin und Amoxicillin/Clavulansäure mit MHK<sub>90</sub> >2 µg/ml oder Cefaclor mit MHK<sub>90</sub> 32 µg/ml schlechter abschnitten. So decken sich unsere Ergebnisse mit denen des „Ketec News Ticker“ aus dem Januar 2002, in welchem darauf hingewiesen wird, daß die klinische Wirksamkeit von Telithromycin inzwischen von mehreren Phase-III-Studien bestätigt sei. Die Ergebnisse mit Telithromycin seien in allen Altersgruppen gleich gut, bei älteren Patienten (über 65 Jahre) sogar signifikant besser. Telithromycin wird hier als First-Line-Therapie vorgeschlagen, da es keine MLS<sub>B</sub>-Resistenz verursacht, die häufigsten Erreger erfaßt, im Gegensatz zu den Makroliden in höheren Konzentrationen bakterizid und gegen Penicillin- bzw. Makrolid-resistente Pneumokokken wirkt. Eine weitere Substanz, die gut gegen grampositive und Penicillin- bzw. Makrolid-resistente Keime wirkt, ist das Oxazolidinon, welches aus einem fünfgliedrigen Oxazolidinonring besteht, an den stets eine Acetamidomethylengruppe so angeknüpft ist, daß sich eine S-Konfiguration ergibt. Linezolid und Eperezolid sind die ersten Vertreter dieser Antibiotikagruppe, die als bakteriostatisch eingestuft werden. Über die Bindungsstelle der Oxazolidinone ist bisher nur so viel bekannt, daß kein anderes Antibiotikum hier angreift. Deshalb gibt es bisher keinerlei Kreuzresistenz zwischen Oxazolidinonen und anderen Antibiotika. Resistenzen an sich entstehen offenbar durch Punktmutationen im Gen der 23S-Untereinheit der Ribosomen. Die MHK von Linezolid soll für Penicillin-empfindliche und -resistente Pneumokokken zwischen 0,5 und 2 µg/ml liegen [128]. Weitere Studien sollten in Zukunft die Wirksamkeit und Resistenzentwicklung der viel versprechenden Substanzen Ketolid und Oxazolidinone beobachten und analysieren. Die epidemiologische Betrachtung soll einen Überblick über

einzelne oder kombinierte Mutationen bei Makrolid- und Tetrazyklin-resistenten europäischen Routineisolaten von *S. pneumoniae* liefern. Im Hinblick auf die aktuelle Literatur wird es in Zukunft interessant sein, den Selektionsdruck beim wohlmöglich gesteigerten Verbrauch der Makrolide und insbesondere der neuen Makrolide zu verfolgen. Auf der letzten International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) wurde im Dezember 2001 in Chicago bereits von ersten Ketolid-resistenten Streptokokken berichtet (Tait-Kamradt, A.G., et al., High-Level Resistent-Streptococci, ICAAC 2001, Poster 1813).

Bezüglich der Chinolonresistenz bei Pneumokokken beschrieben Chen et al. in kanadischen *Surveillance-Studien* in den Jahren 1993-1998 eine ansteigende Chinolonresistenz von 0 auf 1,7% für Ciprofloxacin [74, 75]. Bei MHK-Testung zeigten in unserer Arbeit nur 0,08% der Isolate (1/1191) eine Resistenz gegenüber Levofloxacin, Gatifloxacin und Trovafloxacin und nur 0,13% (2/722) gegenüber Grepafloxacin. Legt man den von Chen et al. festgelegten Wert von  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  für Ciprofloxacin zugrunde, zeigen bei MHK-Bestimmung 1,8% (21/1191) eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin [75]. Tabelle 3 zeigt die Verteilung der MHK-Werte. Generell ist die Resistenz gegen Fluorchinolone bei Pneumokokken in Europa noch relativ selten [76, 77], während in anderen Ländern ein Zunehmen der Resistenz beobachtet wurde [78]. Bei Zugabe von Reserpin zur Blockierung der Effluxpumpe [64] wurde bei den 4 sequenzierten Isolaten mit einem Levofloxacin MHK-Wert von  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  ein Abfall der MHK-Werte um 2-3 Stufen beobachtet, so daß an der Resistenzausprägung ebenfalls ein aktiver Efflux der (hydrophilen) Chinolone beteiligt ist. Die üblichen Alterationen in *S. pneumoniae* an Codon-Position 81 in *gyrA* und an den Positionen 79 und 83 in *parC* konnten wir in unserer Studie belegen (Tabelle 11 im Ergebnisteil). Resistenzmutationen in *gyrB* und *parE*, die ebenfalls beschrieben wurden und offenbar aber klinisch keine große Bedeutung haben [10, 14, 18, 64, 66], waren nicht Inhalt unserer Arbeit. Wir amplifizierten und sequenzierten die 4 Isolate mit einem Levofloxacin MHK-Wert von  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  mittels PCR [66] und konnten die klassischen Alterationen (Ser81Phe oder Tyr in *gyrA* und Ser79Phe und Asp83Asn in *parC*) finden (Tabelle 11). Wie Tab. 3 zeigt, ist nach den hier vorgelegten Untersuchungen anzunehmen, daß sich die Prävalenz einer verminderten Sensibilität gegenüber anderen Fluorchinolonen (Clinafloxacin, Gatifloxacin, Grepafloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin) ähnlich verhält wie die für Levofloxacin und Sparfloxacin bzw. geringer ist. Dennoch ist nach den bisherigen Erfahrungen mit älteren Fluorchinolonen zu befürchten, daß die weltweite Anwendung der neuen Fluorchinolone, besonders bei der Behandlung von Infektionen des Respirationstraktes, in Zukunft zu einem

Anstieg der Fluorocholonresistenz bei Pneumokokken führt, da Mutationen in *gyrA* und *parC* zu einer Zunahme der Resistenz bei Pneumokokken führen. Ziel der vorliegenden Studie war es, die gegenwärtige Genetik der "*quinolone resistance determining region*" von Pneumokokken-Isolaten mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen FQ zu untersuchen und Definitionen bezüglich des Resistenzverhaltens bei Pneumokokken zu finden. Anlehnend an die Literatur wurden bereits verschiedene Mutationen, die zu einer Fluorchinolon-Resistenz führen, beschrieben [17, 39, 92]. Allerdings handelte es sich hierbei meist um Isolate, die im Labor einem Fluorchinolon-Selektionsdruck ausgesetzt oder mit Transformationsverfahren behandelt wurden. Die oben genannten klassischen Alterationen, die wir in unserer Studie in den europäischen und ausschließlich klinischen Isolaten fanden, wurden von anderen Autoren bereits bei anderen Labormutanten oder Routineisolaten beschrieben [17, 39, 92]. Mutationen bei Routineisolaten (Trp93Arg in *gyrA* und Ser80Pro, Arg95Cys oder Lys137Asn in *parC*) [14, 129] und bei Labormutanten (Glu85Lys) [130] konnten wir in unserer Arbeit nicht nachweisen. Diese Mutationen scheinen nicht sicher mit der Fluorchinolon-Resistenz in Zusammenhang zu stehen und eine geringe klinische Bedeutung zu haben. Wir wiesen keine neuen Mutationen mit einer daraus resultierenden verminderten Sensibilität gegenüber Fluorchinolonen in *gyrA* und *parC* nach, so daß scheinbar nur die „klassischen Mutationen“ in *gyrA* und *parC* eine bedeutende Rolle für die Fluorchinolon-Resistenz bei *S. pneumoniae* spielen. Dies unterstützt die von Fukuda und Hiramatsu [10] beschriebene Bedeutung der first-step Mutationen in *gyrA* (Ser81Phe oder Tyr) und *parC* (Ser79Tyr oder Asp83Asn) für das Resistenzverhalten und zeigt, daß diese Mutationen identisch sind mit denen in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen, die unabhängig von ihrer geographischen Herkunft am häufigsten in klinischen Isolaten mit verminderter Sensibilität auftraten.

Einige Autoren machen die chemische Struktur der beteiligten Fluorchinolone für die Reihenfolge der auftretenden Mutationen bei *S. pneumoniae* verantwortlich [10, 131, 132]. Dies bedeutet, daß Fluorchinolone aufgrund ihrer Molekularstruktur bestimmte Angriffsziele bevorzugen. So ist der *par*-Genlocus der Topoisomerase IV das primäre Target von Ciprofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin und Trovafloxacin, während der *gyr*-Genlocus der Gyrase das Target von Gatifloxacin und Sparfloxacin ist. Interessanterweise besitzt Clinalfloxacin beide Genloci als Targets, so daß einer bakteriellen phänotypischen Resistenzlage Mutationen in beiden Genen, *gyrA* und *parC*, vorausgehen müßten. Dies kommt laut Angaben der Literatur jedoch nur relativ selten vor [130, 132].

In der Vergangenheit nahm man an, daß sich zunächst die Topoisomerase IV in *parC* durch Mutationen veränderte. Pan und Fischer kamen in ihren Untersuchungen zu einem anderen Ergebnis. Durch Sparfloxacin wurde zunächst die Gyrase mutante in *gyrA* selektiert, was sich sofort phänotypisch in einer MHK-Erhöhung äußerte. Bei der Topoisomerase IV konnten in den Untersuchungen mit Sparfloxacin jedoch erst Mutationen in *parC* gezeigt werden, wenn in *gyrA* der Gyrase bereits eine Mutation erfolgt war. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß Gyrase mit *gyrA* das primäres Target von Sparfloxacin darstellt [131]. Eine Mutation in *parC* ist nur in Kombination mit einer Mutation in *gyrA* zu beobachten. Die sich anschließenden Untersuchungen zeigten, daß Ciprofloxacin und Levofloxacin Topoisomerase IV als primäres Target haben. [10, 25]. Clinafloxacin, ein Fluorchinolone, greift beide Strukturen gleichermaßen an [132]. Weiterführende Experimente von Pan und Fischer zur *in-vitro* Hemmung der aus Pneumokokken isolierten Enzyme führten jedoch zu dem Ergebnis, daß die Topoisomerase IV durch alle getesteten Fluorchinolone stärker gehemmt wird als die Gyrase. *In-vitro* und *in-vivo* Daten sind also z.T. gegensätzlich, so daß die Frage des primären Targets in Pneumokokken keinsfalls als geklärt betrachtet werden kann [68].

Untersucht man unsere vier sequenzierten Isolate auf Einzel- und Doppelmutationen, so findet man bei allen vier Isolaten eine first-step Einzelmutation in *parC* (drei Mal Ser79Phe und ein Mal Lys137Asn bzw. Asp88Asn). Doppelmutationen konnten wir nicht finden. In unseren Untersuchungen besitzen die getesteten Isolate demnach *parC* als primäres Target. Die genannten Einzelmutationen führen jedoch nicht zu signifikant erhöhten MHK-Werten, solange keine second-step Mutation in *gyrA* hinzukommt. Die MHK-Werte können der Tabelle 11 entnommen werden. Die von Brenwald et al. beschriebenen Efflux-Pumpen, die eine große Bedeutung beim Resistenzmechanismus für Chinolone spielen, waren nicht Thema dieser Arbeit. Brenwald et al. isolierte kürzlich ein Gen *pmrA*, welches homolog zu dem *norA*-Gen bei *S. aureus* war und möglicherweise eine Rolle bei der FQ-Resistenz spielt [11].

Die Ergebnisse der vorliegenden epidemiologischen Betrachtung ermöglichen einen Überblick über die wichtigsten weltweiten einzelnen und kombinierten Mutationen in den QRDRs bei klinischen Routineisolaten von *S. pneumoniae*. Da wir keine neuen signifikanten Mutationen finden konnten, ist es wahrscheinlich, daß alle in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen hinsichtlich ihrer verminderten Sensibilität gegenüber älteren Fluorchinolonen bereits in den letzten Jahren charakterisiert wurden. In Zukunft wird es von Interesse sein, die Folgen des Selektionsdruckes durch den steigenden Gebrauch neuerer Fluorchinolone, die unter anderem auch in dieser Studie verwendet wurden, zu verfolgen.

Zur Klärung der Resistenzmechanismen bei Cotrimoxazol-resistenten Isolaten, bestimmten wir in der vorliegenden Studie zunächst die MHK der 1191 europäischen Isolate: 12,4% der Isolate waren resistent gegenüber Cotrimoxazol (Tabelle 3). Ziel unserer Untersuchungen war es, Definitionen für das Resistenzverhalten zu finden und die gegenwärtige Genetik der *S. pneumoniae* Isolate mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Cotrimoxazol zu analysieren. Dazu haben wir bei 50 willkürlich ausgewählten Isolaten, die sowohl gegenüber Trimethoprim als auch gegenüber Sulfamethoxazol resistent waren, das DHFR Gen mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Bei allen getesteten Isolaten konnten wir eine Ile100Leu Alteration beobachten. Weiterhin wurden die molekularen Ursachen der Resistenz gegen Sulfamethoxazol mittels PCR untersucht. In vorausgehenden Studien zur Sulfonamidresistenz wurde in einer Labormutante eine Duplikation der Aminosäuren 66 und 67 (*sul-d*) in *sulA*, dem chromosomalen DHPS Gen, beschrieben [41]. Zusätzlich berichten einige Autoren über Duplikationen von entweder 3 oder 6 Basen, die eine Wiederholung von ein oder zwei Aminosäuren in der Region von Codon Arg58 zu Tyr63 in der DHPS resistenter Isolate hervorrufen [13, 41, 79, 80]. In unserer Studie besaßen alle 50 getesteten Isolate solche Baseninsertionen (Tabelle 13A-C): GAA kombiniert mit AGC bzw. AGT alleine zwischen Codon 61 und 62, AGT in Kombination mit AGC oder AAC sowie AGT alleine zwischen Codon 62 und 63 als auch AGC kombiniert mit TAT zwischen Codon 63 und 64. Während der Rest der Insertionen schon als Duplikationen beschrieben wurde, die zur Wiederholung von ein oder zwei Aminosäuren in der Codonstruktur führen, sind die beobachteten AAC und GAA Insertionen durch uns zum ersten Mal beschrieben worden. Diese stellen keine Duplikationen von schon existierenden Sequenzen in der *sulA* Region dar. Die MHK-Werte lagen für beide Isolate bei 4µg/ml für Sulfamethoxazol.

Von der höchsten Cotrimoxazol-Resistenz wird aus Südafrika [133], Spanien [85] und Ungarn [119] berichtet. Weiterhin scheint es eine Kreuzresistenz zwischen Penicillin und Cotrimoxazol zu geben [82]. In unserer Studie konnten wir ebenfalls eine Kreuzresistenz feststellen. Bei Cotrimoxazol stieg die prozentuale Resistenz sogar von 4,8% bei Penicillinempfindlichen Stämmen auf 49,4% bei resistenten Isolaten an. Eine Übersicht gibt hierzu Tabelle 4. Betrachtet man parallel zum Sachverhalt der Kreuzresistenz die dazugehörigen  $MHK_{90}$  Werte aus Tabelle 14, so kann man den Penicillinen (Penicillin  $MHK_{90}$  2µg/ml, Amoxicillin  $MHK_{90}$  4µg/ml, Amoxicillin/Clavulansäure  $MHK_{90}$  4µg/ml) eine verminderte Aktivität gegenüber Sulfamethoxazol-resistenten Pneumokokken attestieren. Es wird angenommen, daß die Resistenz gegenüber Sulfamethoxazol bei Pneumokokken durch einen horizontalen Gentransfer des veränderten DHPS Gens entsteht [134, 135]. Analysen des

DHPS- und PBS-Gens könnten weitere Aufschlüsse bezüglich der Kreuzresistenz zwischen Cotrimoxazol und Penicillin liefern. Dies war jedoch nicht Inhalt dieser Arbeit.

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit, einen Überblick über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und die *in-vitro* Aktivitäten verschiedener Substanzen bei klinischen Pneumokokken-Isolaten aus den Jahren 1997-1999 zu liefern und die klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen molekular-epidemiologisch zu untersuchen. Die vorliegende Studie umfasste 1191 Isolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des *SENTRY* Überwachungsprogramms gesammelt wurden.

## 5 Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* ist einer der häufigsten Krankheitserreger beim Menschen. In den letzten Jahren hat die Resistenz gegenüber Penicillin G sowie anderen Antibiotika weltweit deutlich zugenommen. Die vorliegende Studie umfasste 1191 *Streptococcus pneumoniae* Isolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen der SENTRY Surveillance-Studie gesammelt wurden. Die Isolate wurden hinsichtlich ihrer *in-vitro* Aktivitäten gegenüber 30 verschiedenen Antibiotika-Substanzen getestet. Bei den resistenten Isolaten erfolgte die Analyse der wichtigsten Resistenzmechanismen mit molekular-biologischen Methoden. Diese Arbeit ermöglicht somit einen Überblick über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und die *in-vitro* Aktivitäten neuerer Substanzen bei klinischen Pneumokokken-Isolaten und kann Tendenzen in Hinblick auf Multiresistenz aufzeigen.

Die untersuchten Isolate der SENTRY-Studie wurden von Patienten mit positiven Blutkulturen sowie mit ambulant bzw. nosokomial erworbenen Pneumonien gewonnen. Die Identifikation der Pneumokokkenstämme erfolgte anhand des MicroScan Walk Away 96 Systems sowie der Prüfung auf Optochinempfindlichkeit mittels Testblättchen. Die Verifizierung der Resistenzlage der einzelnen Isolate erfolgte mittels Agardiffusionstests. Die Messung der spezifischen MHK-Werte wurde nach dem Mikrotiterverfahren in Müller-Hinton-Medium durchgeführt. Die molekular-biologische Charakterisierung wurde mit Hilfe der PCR-Methode und anschließender Sequenzierung gesichert.

Bei 73% der Makrolid-resistenten Erreger ließ sich das *ermB*-Gen nachweisen, lediglich 27% wiesen das *mefE*-Gen auf. Mutationen in der 23 S rRNA und/oder den ribosomalen Proteinen L4 und L22 konnten nicht nachgewiesen werden. Die Tetrazyklin-Resistenz war nur mit dem *tetM*-Gen assoziiert. Alle Trimethoprim-resistenten Isolate wiesen eine Ile100→Leu Alteration in der Dihydrofolsäurereduktase auf, während die Sulfonamid-Resistenz auf Duplikationen im Dihydropteroatsynthetase-Gen *sulA* zurückgeführt werden kann. Bei den vier Isolaten mit erhöhten Levofloxacin-MHK-Werten ließen sich neben den klassischen Alterationen in *gyrA* (Ser81→Phe oder Tyr) und *parC* (Ser79→Phe und Asp83→Asn) auch Efflux-Aktivitäten nachweisen.

Sowohl die *in-vitro* als auch die auf molekularer Ebene ermittelten Daten unserer Studie zeigen eine durchaus als dramatisch einzustufende Entwicklung der (Multi-)Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* gegenüber verschiedenen Antibiotika bzw. deren Kombinationen. Die klassischen Mutationen bezüglich der einzelnen Substanzen wurden bestätigt. Mutationen im *tetO*-Gen und in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 konnten nicht gefunden werden,

so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Mutationen zurzeit keine klinische Relevanz haben. Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung, die sich auch in diesen Ergebnissen widerspiegelt, wird es wahrscheinlich auch in Deutschland bzw. in anderen europäischen Ländern in Zukunft zu einem deutlichen Anstieg resistenter Pneumokokken kommen. Zur Erklärung dieses Phänomens kann der Prozeß der Kreuzresistenz bzw. die klonale Ausbreitung herangezogen werden, was die unterschiedliche geographische Verteilung einiger Gene erklären würde. Eine weitere mögliche Erklärung für die Dominanz einiger Gene, wie z.B. die des *tetM* Gens, wäre das gemeinsame Vorkommen der beiden Gene *ermB* und *tetM* auf demselben Transposon *Tn* 1545. Im Hinblick auf die aktuelle Literatur wird es in Zukunft interessant sein, den Selektionsdruck bei wohlmöglich gesteigertem Antibiotikaverbrauch, insbesondere neuerer Substanzen wie z.B. der neuen Fluorchinolone sowie Ketolide zu verfolgen.

**6 Literatur**

1. Gay, K., et al., The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population-based assessment. *J Infect Dis*, 2000. 182(5): p. 1417-24.
2. Spika, J.S., et al., Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1979-1987. The Pneumococcal Surveillance Working Group. *J Infect Dis*, 1991. 163(6): p. 1273-8.
3. Leggiadro, R.J., Y. Davis, and F.C. Tenover, Outpatient drug-resistant pneumococcal bacteremia. *Pediatr Infect Dis J*, 1994. 13(12): p. 1144-6.
4. Schuchat, A., et al., Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerg Infect Dis*, 2001. 7(1): p. 92-9.
5. Prevalence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*--Connecticut, 1992-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1994. 43(12): p. 216-7, 223.
6. Adrian, P.V. and K.P. Klugman, Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(11): p. 2406-13.
7. Depardieu, F. and P. Courvalin, Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(1): p. 319-23.
8. Drlica, K. and X. Zhao, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. 61(3): p. 377-92.
9. Fitoussi, F., et al., Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(2): p. 636-8.
10. Fukuda, H. and K. Hiramatsu, Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(2): p. 410-2.
11. Gill, M.J., N.P. Brenwald, and R. Wise, Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(1): p. 187-9.
12. Grewal, J., E.K. Manavathu, and D.E. Taylor, Effect of mutational alteration of Asn-128 in the putative GTP-binding domain of tetracycline resistance determinant Tet(O) from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. 37(12): p. 2645-9.
13. Huovinen, P., et al., Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. 39(2): p. 279-89.
14. Jorgensen, J.H., et al., Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* loci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(2): p. 329-34.
15. Leclercq, R. and P. Courvalin, Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991. 35(7): p. 1273-6.
16. Nishijima, T., et al., Distribution of *mefE* and *ermB* genes in macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and their variable susceptibility to various antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 1999. 43(5): p. 637-43.
17. Pan, X.S. and L.M. Fisher, Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J Bacteriol*, 1996. 178(14): p. 4060-9.
18. Pestova, E., et al., Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(8): p. 2000-4.

19. Schmitz, F.J., J. Verhoef, and A.C. Fluit, Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. SENTRY Participants Group. *J Antimicrob Chemother*, 1999. 43(6): p. 783-92.
20. Shortridge, V.D., et al., Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996. 26(2): p. 73-8.
21. Sutcliffe, J., A. Tait-Kamradt, and L. Wondrack, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(8): p. 1817-24.
22. Tait-Kamradt, A., et al., *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(10): p. 2251-5.
23. Tait-Kamradt, A., et al., Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(12): p. 3395-401.
24. Tait-Kamradt, A., et al., Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(8): p. 2118-25.
25. Varon, E., et al., ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(2): p. 302-6.
26. Vester, B. and S. Douthwaite, Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(1): p. 1-12.
27. Widdowson, C.A., K.P. Klugman, and D. Hanslo, Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(12): p. 2891-3.
28. Zeller, V., et al., Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(9): p. 1973-8.
29. Standards, N.C.f.C.L., Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighth informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1998. NCCLS document M100-S8.
30. Thornsberry, C. and D.F. Sahn, Antimicrobial resistance in respiratory tract pathogens: results of an international surveillance study. *Chemotherapy*, 2000. 46 Suppl 1: p. 15-23.
31. Seppala, H., et al., Resistance to erythromycin in group A streptococci. *N Engl J Med*, 1992. 326(5): p. 292-7.
32. Zhong, P., et al., Induction of ribosome methylation in MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides. *Microb Drug Resist*, 1999. 5(3): p. 183-8.
33. Douthwaite, S. and W.S. Champney, Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J Antimicrob Chemother*, 2001. 48 Suppl T1: p. 1-8.
34. Luna, V.A., et al., A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chemother*, 1999. 44(1): p. 19-25.
35. Rudolph, K.M., et al., Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis*, 2000. 182(2): p. 490-6.
36. Santagati, M., et al., Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(9): p. 2585-7.

37. Sutcliffe, J., et al., Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(11): p. 2562-6.
38. Taylor, D.E. and A. Chau, Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(1): p. 1-5.
39. Tankovic, J., et al., Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(11): p. 2505-10.
40. Widdowson, C.A. and K.P. Klugman, Emergence of the M phenotype of erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. *Emerg Infect Dis*, 1998. 4(2): p. 277-81.
41. Widdowson, C.A. and K.P. Klugman, Molecular mechanisms of resistance to commonly used non-beta-lactam drugs in *Streptococcus pneumoniae*. *Semin Respir Infect*, 1999. 14(3): p. 255-68.
42. Clancy, J., et al., Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*, 1996. 22(5): p. 867-79.
43. Roberts, M.C., et al., Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(12): p. 2823-30.
44. Weisblum, B., Macrolide resistance. *Drug Resistance*. Update1: 29-41.
45. Syrogiannopoulos, G.A., et al., Identification of an *erm(A)* erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(1): p. 342-4.
46. Gregory, S.T. and A.E. Dahlberg, Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *J Mol Biol*, 1999. 289(4): p. 827-34.
47. Manavathu, E.K., et al., Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(1): p. 71-7.
48. Sanchez-Pescador, R., et al., Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(3): p. 1218.
49. Burdett, V., tRNA modification activity is necessary for Tet(M)-mediated tetracycline resistance. *J Bacteriol*, 1993. 175(22): p. 7209-15.
50. Speer, B.S., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev*, 1992. 5(4): p. 387-99.
51. Burdett, V., J. Inamine, and S. Rajagopalan, Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. *J Bacteriol*, 1982. 149(3): p. 995-1004.
52. Burdett, V., Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. *J Bacteriol*, 1986. 165(2): p. 564-9.
53. Tobian, J.A., M.L. Cline, and F.L. Macrina, Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from the chromosome of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 1984. 160(2): p. 556-63.
54. Martin, P., P. Trieu-Cuot, and P. Courvalin, Nucleotide sequence of the tetM tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res*, 1986. 14(17): p. 7047-58.
55. McMurry, L., R.E. Petrucci, Jr., and S.B. Levy, Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(7): p. 3974-7.

56. Franke, A.E. and D.B. Clewell, Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol*, 1981. 145(1): p. 494-502.
57. Inamine, J.M. and V. Burdett, Structural organization of a 67-kilobase streptococcal conjugative element mediating multiple antibiotic resistance. *J Bacteriol*, 1985. 161(2): p. 620-6.
58. Fitzgerald, G.F. and D.B. Clewell, A conjugative transposon (Tn919) in *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun*, 1985. 47(2): p. 415-20.
59. Roberts, M.C., et al., Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal tetM sequences. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985. 28(1): p. 141-3.
60. Speer, B.S. and A.A. Salyers, Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J Bacteriol*, 1989. 171(1): p. 148-53.
61. Linares, J., et al., Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin Infect Dis*, 1992. 15(1): p. 99-105.
62. Huebner, R.E., A.D. Wasas, and K.P. Klugman, Trends in antimicrobial resistance and serotype distribution of blood and cerebrospinal fluid isolates of *Streptococcus pneumoniae* in South Africa, 1991-1998. *Int J Infect Dis*, 2000. 4(4): p. 214-8.
63. Verhaegen, J., et al., Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Belgium-update (1994-98). *Clin Microbiol Infect*, 2000. 6(6): p. 308-15.
64. Bast, D.J., et al., Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(11): p. 3049-54.
65. Boos, M., et al., In vitro development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(3): p. 938-42.
66. Jones, M.E., et al., Prevalence of gyrA, gyrB, parC, and parE mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(2): p. 462-6.
67. Sahloul, R.T., R.J. Stanek, and M.A. Mufson, Surveillance of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in one American metropolitan area, 1989-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000. 19(9): p. 704-7.
68. Pan, X.S. and L.M. Fisher, *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(5): p. 1129-36.
69. Stermitz, F.R., et al., Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(4): p. 1433-7.
70. Renau, T.E., et al., Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J Med Chem*, 1999. 42(24): p. 4928-31.
71. Rodloff, A., Bedeutung der lokalen Resistenzsituation. *Chemotherapiejournal*, 1999. 8(Suppl. 18): p. 11-18.
72. Kresken, M., Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemotherapiejournal*, 2000. 9: p. 51-86.
73. Brenwald, N.P., M.J. Gill, and R. Wise, Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(8): p. 2032-5.
74. Zhanel, G.G., et al., Prevalence of antimicrobial resistance in respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a Canadian national surveillance study. *The*

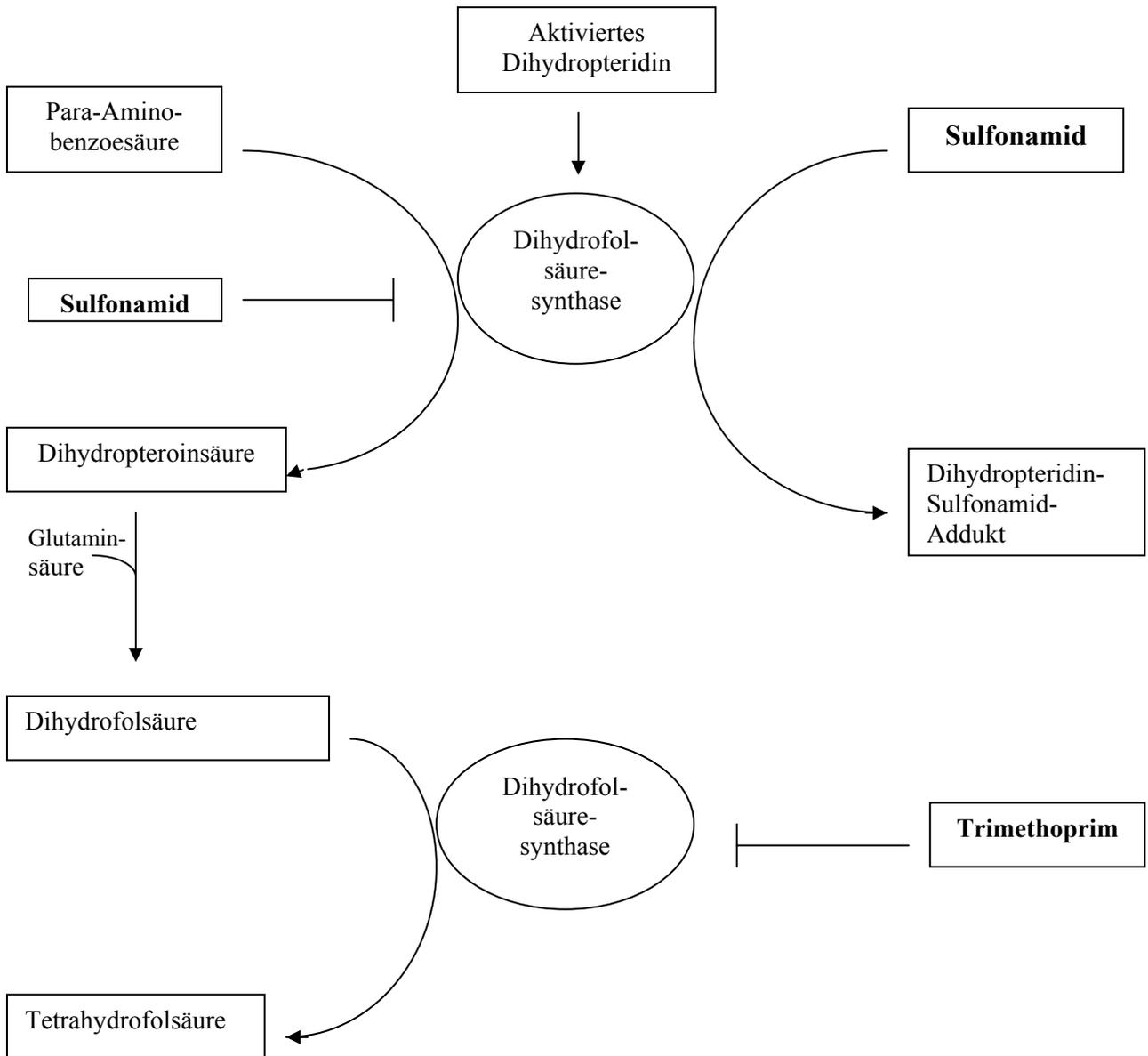
- Canadian Respiratory Infection Study Group. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(10): p. 2504-9.
75. Chen, D.K., et al., Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Canadian Bacterial Surveillance Network. *N Engl J Med*, 1999. 341(4): p. 233-9.
  76. Marchese, A., E.A. Debbia, and G.C. Schito, Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander Project. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 46 Suppl T1: p. 11-5.
  77. Milatovic, D., et al., In vitro activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(4): p. 1102-7.
  78. Baquero, F., et al., Antimicrobial resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(2): p. 357-9.
  79. Lopez, P., et al., Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol*, 1987. 169(9): p. 4320-6.
  80. Maskell, J.P., A.M. Sefton, and L.M. Hall, Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(10): p. 2121-6.
  81. Howe, J.G. and T.S. Wilson, Co-trimoxazole-resistant pneumococci. *Lancet*, 1972. 2(7769): p. 184-5.
  82. Klugman, K.P., Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev*, 1990. 3(2): p. 171-96.
  83. del Castillo, F., F. Baquero-Artigao, and A. Garcia-Perea, Influence of recent antibiotic therapy on antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media in Spain. *Pediatr Infect Dis J*, 1998. 17(2): p. 94-7.
  84. Felmingham, D. and R.N. Gruneberg, The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 45(2): p. 191-203.
  85. Perez, J.L., et al., Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in childhood carriers. *J Antimicrob Chemother*, 1987. 19(2): p. 278-80.
  86. Klugman, K.P., et al., Carriage of penicillin resistant pneumococci. *Arch Dis Child*, 1986. 61(4): p. 377-81.
  87. Klugman, K.P., H.J. Koornhof, and V. Kuhnle, Clinical and nasopharyngeal isolates of unusual multiply resistant pneumococci. *Am J Dis Child*, 1986. 140(11): p. 1186-90.
  88. Hakenbeck, R., et al., beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol*, 1999. 33(4): p. 673-8.
  89. Dowson, C.G., et al., Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. 38(1): p. 49-53.
  90. Grebe, T. and R. Hakenbeck, Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(4): p. 829-34.
  91. Kayser, F.H., et al., Erreger bakterieller Infektionskrankheiten. *Medizinische Mikrobiologie*, 1993. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

92. Janoir, C., et al., High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(12): p. 2760-4.
93. Yan, S.S., et al., Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(11): p. 3196-8.
94. Latini, L., et al., Prevalence of *mefE*, *erm* and *tet(M)* genes in *Streptococcus pneumoniae* strains from Central Italy. *Int J Antimicrob Agents*, 1999. 13(1): p. 29-33.
95. Schmitz, F.J., S. Kuchta, and H.P. Heinz, Evaluation of the MicroScan WalkAway 96 System. *Clin Lab*, 1997. 43: p. 39-51.
96. Ausubel, F., et al., *Current protocols in molecular biology*. Jon Wiley & Sons, 1989. Inc.(New York, N.Y.).
97. Chiou, C.C., et al., Extremely high prevalence of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Kaohsiung, Taiwan. *J Clin Microbiol*, 1998. 36(7): p. 1933-7.
98. Christenson, B., S.P. Sylvan, and B. Noreen, Carriage of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in the Stockholm area. *Scand J Infect Dis*, 1997. 29(6): p. 555-8.
99. Abraham, E.P. and E. Chain, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*, 1988. 10(4): p. 677-8.
100. Abraham, E.P., et al., Further observations on penicillin. 1941. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992. 42(1): p. 3-9.
101. Kirby, W.M., Therapeutic aspects of staphylococcal disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1965. 128(1): p. 443-50.
102. Kislak, J.W., et al., Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci*, 1965. 250(3): p. 261-8.
103. Allen, K.D., Penicillin-resistant pneumococci. *J Hosp Infect*, 1991. 17(1): p. 3-13.
104. Thornsberry, C., P.H. Burton, and B.H. Vanderhoof, Activity of penicillin and three third-generation cephalosporins against US isolates of *Streptococcus pneumoniae*: a 1995 surveillance study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996. 25(2): p. 89-95.
105. Sahm, D.F., et al., Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 45(4): p. 457-66.
106. Witte, W. and I. Klare, Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. Mikrobiologisch-epidemiologische Aspekte. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 1999. 42: p. 8-16.
107. Schweiger, A., Ketolid bietet sichere First-Line-Therapie. *Fachpresse Infotainment*, "Ketek News Ticker", 2002.
108. Mason, E.O., Jr., et al., *Streptococcus pneumoniae* in the USA: in vitro susceptibility and pharmacodynamic analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 45(5): p. 623-31.
109. Barnes, D.M., et al., Transmission of multidrug-resistant serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain in vivo. *J Infect Dis*, 1995. 171(4): p. 890-6.
110. Pradier, C., et al., Pneumococcal resistance patterns in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997. 16(9): p. 644-7.
111. Miller, Y.W., et al., Sequential antibiotic therapy for acne promotes the carriage of resistant staphylococci on the skin of contacts. *J Antimicrob Chemother*, 1996. 38(5): p. 829-37.

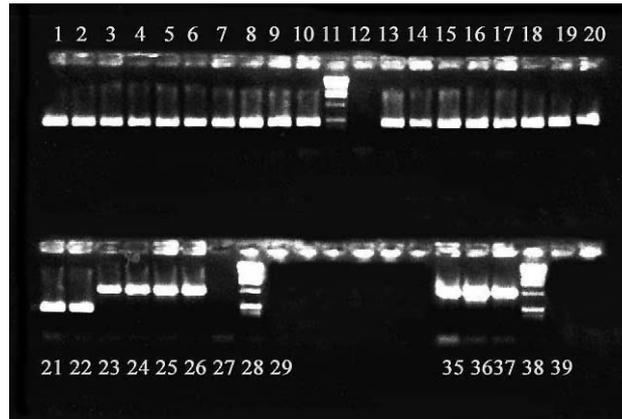
112. Trzcinski, K., et al., Characterization of two different clusters of clonally related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by conventional and molecular typing. *J Hosp Infect*, 1994. 28(2): p. 113-26.
113. Seppala, H., et al., The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *N Engl J Med*, 1997. 337(7): p. 441-6.
114. Ferber, T., *Kongress & Journal News*. 2001.
115. Nasrin, D., Effect of beta lactam antibiotic use in children on pneumococcal resistance to penicillin: prospective cohort study. *BMJ*, 2002. 324: p. 28.
116. Fenoll, A., et al., Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis*, 1991. 13(1): p. 56-60.
117. Marchese, A., et al., Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 1999. 44(4): p. 461-4.
118. Seppala, H., et al., A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(2): p. 257-62.
119. Marton, A., Epidemiology of resistant pneumococci in Hungary. *Microb Drug Resist*, 1995. 1(2): p. 127-30.
120. Descheemaeker, P., et al., Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2000. 45(2): p. 167-73.
121. Shortridge, V.D., et al., Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin Infect Dis*, 1999. 29(5): p. 1186-8.
122. Johnston, N.J., et al., Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(9): p. 2425-6.
123. Hall, L.M., Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol*, 1998. 51(4): p. 270-4.
124. Lefevre, J.C., et al., Pulsed field gel electrophoresis for molecular epidemiology of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Pathol Biol (Paris)*, 1994. 42(5): p. 547-52.
125. McDougal, L.K., et al., Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(10): p. 2176-84.
126. Klugman, K.P., The global spread of antibiotic-resistant pneumococcal clones. In: *International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (Helsingor, Denmark)*. 1998.
127. Courvalin, P. and C. Carrier, Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet*, 1986. 205(2): p. 291-7.
128. von Eiff, C., Aktuelle Daten zur antibakteriellen Aktivität von Linezolid. In: von Eiff, C. (Hrg.), *Oxazolidinone - Aktuelle Erkenntnisse zu einer neuen Klasse von Antibiotika*. SMV Wessobrunn, 2001: p. 23-40.
129. Taba, H. and N. Kusano, Sparfloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: involvement of multiple mutations in *gyrA* and *parC* genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(9): p. 2193-6.
130. Pan, X.S., et al., Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(10): p. 2321-6.

131. Pan, X.S. and L.M. Fisher, Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(2): p. 471-4.
132. Pan, X.S. and L.M. Fisher, DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(11): p. 2810-6.
133. Koornhof, H.J., A. Wasas, and K. Klugman, Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a South African perspective. *Clin Infect Dis*, 1992. 15(1): p. 84-94.
134. Radstrom, P., et al., Transformational exchanges in the dihydropteroate synthase gene of *Neisseria meningitidis*: a novel mechanism for acquisition of sulfonamide resistance. *J Bacteriol*, 1992. 174(20): p. 6386-93.
135. Dowson, C.G., et al., Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(22): p. 8842-6.

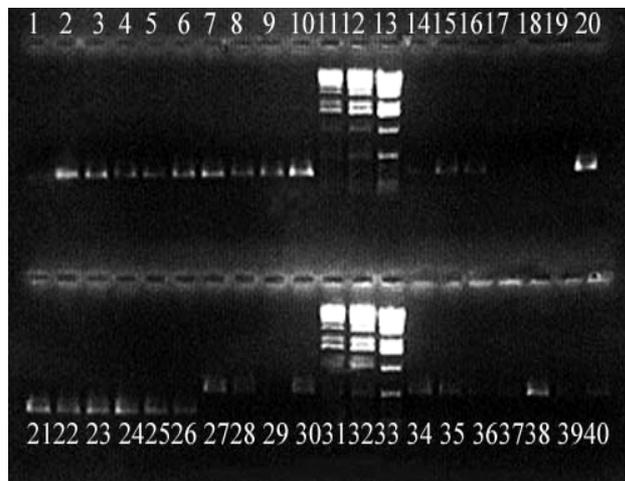
7 **Bildanhang**



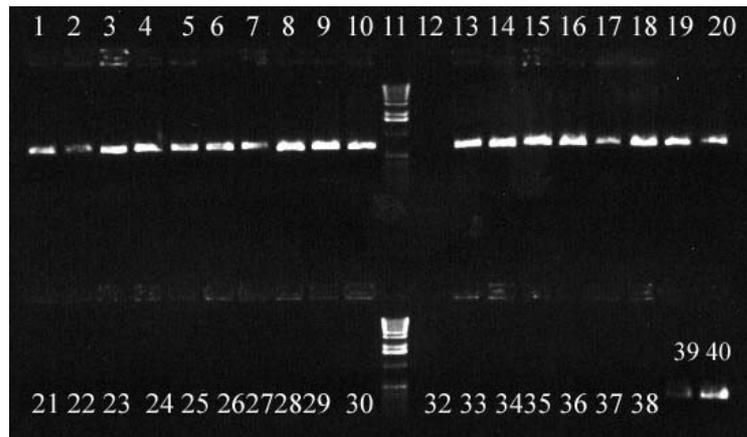
**Abbildung 1** Wirkungsmechanismus von Sulfonamiden und Diaminobenzylpyrimidinen



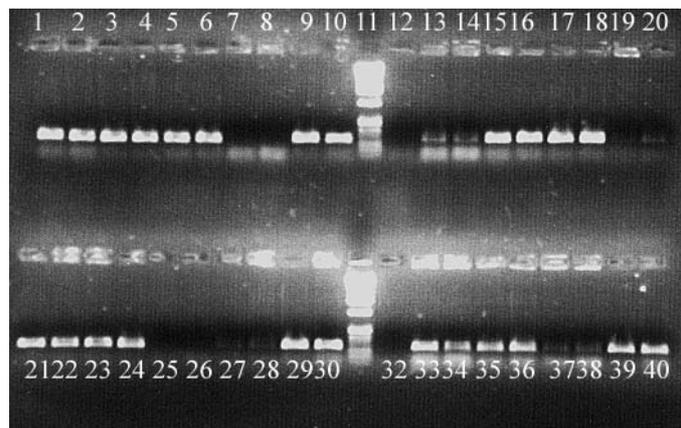
**Abbildung 2** Gelbild einer PCR nach erfolgter Elektrophorese (*S. pneumoniae*). Die Positionen 11, 28 und 38 beinhalten den 1 Kb DNA-Molekulargewichtsmarker, bei Position 12, 27 und 39 ist die Blindprobe aufgetragen.



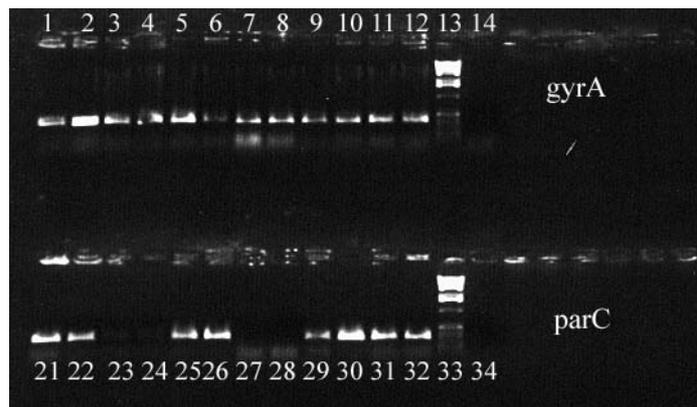
**Abbildung 3** Gelbild einer aufgereinigten PCR (*S. pneumoniae*); die Positionen 11 und 31 zeigen den 1 Kb DNA-Molekulargewichtsmarker, bei den Positionen 11 und 32 liegen die mittelstark konzentrierten Marker vor, und die Positionen 13 und 33 beinhalten den schwach konzentrierten Marker



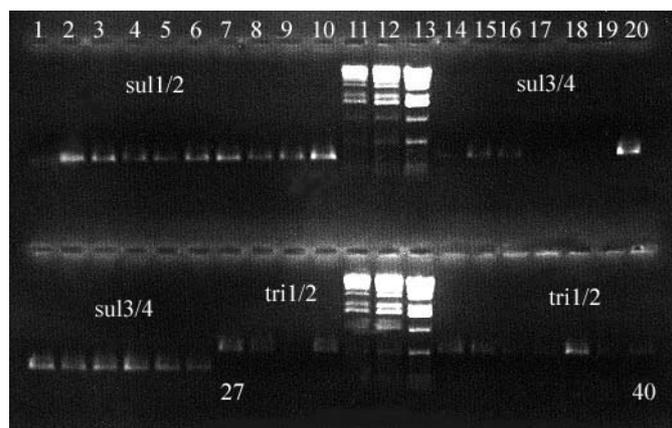
**Abbildung 4** Gelbild einer PCR nach erfolgter Elektrophorese. In der oberen Reihe (1-20) wurden die Isolate auf *ermB* und in der unteren Reihe (21-40) auf *mefE* getestet. In Position 11 und 31 befindet sich der Blue-Marker, in Position 12 und 32 die Wasserproben der jeweiligen PCR-Ansätze und in Position 19+20 bzw. 39+40 befinden sich die Kontrollstämme für *ermB* bzw. *mefE*.



**Abbildung 5** Gelbild einer Elektrophorese nach Screening auf *tetM*. Die Wasserproben befinden sich in Position 12 und 32, die Blue-Marker sind in Position 11 bzw. 31 und der Kontrollstamm in Position 39 und 40 aufgetragen.



**Abbildung 6** PCR-Gelbild nach *gyrA* und *parC*-Screening.



**Abbildung 7** Gelbild einer aufgereinigten PCR. Untersucht wurden die Gene DHPS (*sulA*; *sul1/2* und *sul<sup>3/4</sup>*) und DHFR (*tri1/2*). In Position 1-26 befinden sich die „slots“ für *sulA*, in 27 bis 40 die für *tri1/2*.

## 8 Tabellenanhang

**Tabelle 3:**

Verteilung der MHK-Werte (in  $\mu\text{g/ml}$ ) der getesteten Antibiotika für 1191 *S. pneumonia* Isolate  
*Erste Spalte:* MHK-Wert, *zweite Spalte:* Anzahl der Isolate mit dem jeweiligen MHK-Wert,  
*dritte Spalte:* sich ergebender Prozentsatz auf die Gesamtheit der getesteten Isolate bezogen,  
*vierte Spalte:* kumulativer Prozentsatz

**Amoxicillin** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0,06$	899	75,5	75,5
0,12	47	3,9	79,4
0,25	48	4	83,4
0,5	49	4,1	87,5
1	58	4,9	92,4
2	52	4,3	96,7
4	21	1,8	98,5
8	12	1	99,5
>8	5	0,4	100

**Amoxicillin/Clavulansäure** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0,25$	990	83,1	83,1
0,5	50	4,2	87,3
1	63	5,3	92,6
2	49	4,1	96,7
4	27	2,3	99
8	10	0,8	99,8
>8	2	0,2	100

**Penicillin** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0.03$	774	65	65.0
0.06	91	7,6	72.6
0.12	66	5,5	78.1
0.25	59	5	83.1
0.5	45	3,8	86.9
1	67	5,6	92.5
2	65	5,5	98.0
4	21	1	99.8
$>4$	3	0,3	100.0

**Cefadroxil** (n=1191)

$\leq 1$	498	41,8	41.8
2	362	30,4	72.2
4	104	8,7	80.9
8	52	4,4	85.3
$>8$	175	14,7	100

**Cefaclor** (n=469)

-	722		-
$\leq 0.25$	130	27,7	27,7
0.5	147	31,3	59.0
1	89	19	78.0
2	23	4,9	82.9
4	14	3	85.9
8	8	1,7	87.6
16	10	2,1	89.7
32	15	3,2	92.9
$>32$	33	7	100

**Ceftibuten (n=723)**

-	468	-	-
<=0.06	1	0.1	0.1
0.12	1	0.1	0.2
0.25	2	0.3	0.5
0.5	9	1,2	1,7
1	38	5,2	6,9
2	239	33,1	40,0
4	190	26,3	66,3
>4	243	33,6	99,9

**Cefprozil (n=1191)**

<=0.12	382	32.1	32.1
0.25	317	26,6	58.7
0.5	208	17,5	76.5
1	65	5,5	81.7
2	45	3,8	85.5
4	47	3,9	89.4
8	60	5,0	94.4
16	46	3,9	98.3
>16	21,0	1,8	100

**Cefuroxime (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )**

<=0.06	770	64.7	64.7
0.12	67	5,6	70.3
0.25	73	6,1	76.4
0.5	59	5.0	81.4
1	43	3,6	85.0
2	59	5.0	90.0
4	83	7.0	97.0
8	34	2,9	99.9
>8	3	0.3	100

**Cefixime (n=467)**

-	724	-	-
0,03	51	10,9	10,9
0,06	39	8,4	19,3
0,12	85	18,2	37,5
0,25	127	27,2	64,7
0,5	40	8,6	73,3
1	17	3,6	76,9
2	23	4,9	81,8
4	22	4,7	86,5
4	63	13,5	100

**Cefotaxime (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )**

$\leq 0,008$	289	24,3	24,3
0,015	366	30,7	55
0,03	181	15,2	70,2
0,06	62	5,2	75,4
0,12	74	6,2	81,6
0,25	54	4,5	86,1
0,5	68	5,7	91,8
1	78	6,5	98,3
2	15	1,3	99,6
4	2	0,2	99,8
>4	2	0,2	100

**Cefpodoxime (n=1191)**

$\leq 0,03$	752	63,1	63,1
0,06	108	9,1	72,2
0,12	55	4,6	76,8
0,25	64	5,4	82,2
0,5	39	3,3	85,5
1	62	5,2	90,7
2	84	7,1	97,8
4	24	2,1	99,8
>4	3	0,3	100

**Ceftazidime (n=722)**

-	469	-	-
≤0,25	434	60,1	60,1
0,5	72	10	70,1
1	46	6,4	76,5
2	29	4	80,5
4	43	6	86,05
8	52	7,2	93,7
16	41	5,7	99,4
32	5	0,7	100

**Cefepime (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger ≥2µg/ml)**

≤0,06	856	71,9	71,9
0,12	65	5,5	77,4
0,25	65	5,5	82,9
0,5	76	6,4	89,3
1	90	7,6	96,9
2	29	2,4	99,3
4	3	0,3	99,6
8	6	0,5	100
>8	1	0,1	100

**Loracarbef (n=722)**

-	469	-	-
≤0,25	69	9,6	9,6
0,50	196	27,1	36,7
1,0	248	34,3	71,0
2	67	9,3	80,3
4	17	2,4	82,7
8	10	1,4	84,1
16	14	1,9	86
32,0	21	2,9	89
>32	80	11,1	100,0

**Ciprofloxacin (n=1191)**

≤0,015	3	0,30	0,30
0,03	1	0,1	0,4
0,06	2	0,2	0,6
0,12	10	0,8	1,4
0,26	39	3,3	4,7
0,5	417	35,0	39,0
1	574	48,2	87,9
2	124	10,4	98
>2	21	1,8	100

**Levofloxacin (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger ≥8µg/ml)**

≤0,5	440	36,9	36,9
1	696	58,4	95,3
2	51	4,3	100
4,0	3	0,3	100
>4	1	0,1	100,0

**Sparfloxacin (n=469)**

-	722	-	-
≤0,12	82	17,5	17,5
0,25	202	43,1	60,6
0,5	176	37,5	98,1
1	9	1,9	100,0

**Gatifloxacin (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger ≥4µg/ml)**

≤0,03	11	0,9	0,9
0,06	10	1,6	2,5
0,12	327	27,5	30,0
0,25	703	59,0	89,0
0,50	126	10,6	99,6
1	3	0,3	99,9
2	1	0,1	100,0
4	0	0,0	100
>4	1	0,1	100

**Trovafloxacin (n=1191)**

≤0,03	45	3,8	3,8
0,06	260	21,8	25,6
0,12	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	0,0	99,9
4	1	0,1	100

**Grepafoxacin (n=722)**

≤0,12	442	61,2	61,2
0,25	248	34,3	95,5
0,5	25	3,5	99,0
1	5	0,7	99,7
>1	2	0,3	100,0

**Erythromycin (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger ≥1µg/ml)**

≤0,25	928	77,9	77,9
0,5	32	2,7	80,6
1	29	2,4	83,0
2	18	1,5	84,5
4	15	1,3	85,8
8	5	0,4	86,2
16	7	0,6	86,8
32	15	1,3	88
>32	142	11,9	100

**Clindamycin** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 1\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0,06$	972	81,6	81,6
0,12	36	3,0	24,6
0,25	8	0,7	85,3
0,5	5	0,4	85,7
1	5	0,4	86,1
2	2	0,2	86,3
4	9	0,8	87,1
8	14	1,2	88
>8	140	11,8	100

**Azithromycin** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0,12$	918	77,1	77,1
0,25	22	1,8	78,9
0,50	18	1,5	80,4
1,0	20	1,7	82,1
2	18	1,5	83,6
4	12	1,0	84,6
8	5	0,4	85,0
16	15	1,3	86
>16	163	13,7	100

**Clarithromycin** (n=1191) (Grenzwert für resistente Erreger  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ )

$\leq 0,25$	953	80,0	80,0
0,5	20	1,7	81,7
1	29	2,4	84,1
2	10	0,8	84,9
4	8	0,7	85,6
8	7	0,6	86,2
16	8	0,7	86,9
32	11	0,9	87,8
>32	145	12,2	100

**Quinupristin/Dalfopristin (n=1191)**

≤0,06	30	2,5	2,5
0,12	82	6,9	9,4
0,25	369	31,0	40,4
0,5	473	39,7	80,1
1	206	17,3	97,4
2	30	2,5	99,9
4	0	0,0	99,9
8	0	0,0	99,9
>8	1	0,1	100

**Vancomycin (n=1191)**

≤0,12	271	22,8	22,8
0,25	412	34,6	57,4
0,5	471	39,5	96,9
1	36	3,0	99,9
2	1	0,1	100,0

**Chloramphenicol (n=1191)**

≤2	997	83,7	83,7
4	90	7,6	91,3
8	41	3,9	95,2
16	53	4,5	99,7
>16	5	0,4	100

**Rifampicin (n=469)**

–	722	–	–
≤1	465	99,1	99,1
2	3	0,9	100,0

**Tetracycline (n=1191)**

≤2	891	74,8	74,8
4	18	1,5	76,3
8	35	2,9	79,2
16	63	5,3	84,5
>16	184	15,4	100

**Trimethoprim/Sulfamethoxazole (n=1191)**

≤0,25	822	69,0	69,0
0,5	64	5,4	74,4
1	53	4,5	78,9
2	104	8,7	87,6
4	124	10,4	98,0
8	24	2,0	100,0

**Tabelle 4:**

Ausgewählte Kreuzresistenzanalysen für Penicillin-empfindliche (PenS), -intermediäre (PenI) und resistente (PenR) *S. pneumoniae*-Isolate in Prozent (%)

	<b>PenS</b>	<b>PenI</b>	<b>PenR</b>
<b>Amoxicillin</b>	0,1	9,3	74,7
<b>Amoxicillin/Clavulansäure</b>	0,3	10,1	70,1
<b>Cefuroxim</b>	0,3	38,8	95,4
<b>Devotaxim</b>	0	1,7	17,2
<b>Cefepim</b>	0,1	4,6	31
<b>Erythromycin</b>	10,4	38,8	55,2
<b>Clindamycin</b>	6,5	30	49,4
<b>Tetrazyklin</b>	16,1	39,2	51,7
<b>Sulfamethoxazol/Trimethoprim</b>	4,8	26,6	49,4
<b>Levofloxacin</b>	0,1	0	0

**Tabelle 5**

Ausgewählte Isolate mittels Testblättchen (Optochin, Erythromycin, Doxycyclin, Cotrim, Ciprofloxacin, Clindamycin u.Rifampicin) und DADE getestet

AN	ENARE	Optochin	DADE	Erythromycin	Doxycyclin	Cotrim	Ciprofloxacin	Clindamycin	Rifampicin
1	P02A301	S	pneumoniae	R	S	S	I	S	S
2	P17B062	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
3	P19B164	S	pneumoniae	R	R	I	R	R	S
4	P17B060	S	pneumoniae	R	R	R	I	I	S
5	P14B043	S	pneumoniae	R	R	R	I	S	S
6	P18A113	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
7	P15B152	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
8	P18A488	S	pneumoniae	R	R	I	S	R	S
9	P25B019	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
10	P17B053	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
11	P18B098	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
12	P17C137	S	pneumoniae	R	R	I	I	R	S
13	P19B168	S	pneumoniae	R	S	S	S	R	S
14	P17C072	S	pneumoniae	R	R	R	S	S	S
15	P17C180	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
16	P16B054	S	pneumoniae	R	R	R	S	S	S
18	P18A364	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S
19	P17B056	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
20	P17B051	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
21	P17B058	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
22	P14B068	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
23	P17B061	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
24	P17B044	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
25	P13B152	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	S
26	P14B186	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
27	P17C134	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
28	P15B026	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
29	P13B153	S	pneumoniae	S	R	I	S	S	S
30	P15C053	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S

Tabellenanhang

31	<b>P17B045</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
32	<b>P18B165</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
33	<b>P19B163</b>	S	pneumoniae	R	R	R	R	R	S
34	<b>P10B181</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
35	<b>P18B187</b>	S	pneumoniae	R	S	I	I	R	S
37	<b>P18B095</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
38	<b>P18B199</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
39	<b>P10B182</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
40	<b>P18B168</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
43	<b>P17B151</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
44	<b>P25B012</b>	S	pneumoniae	S	S	S	I	S	S
45	<b>P10B168</b>	S	pneumoniae	R	R	I	S	R	S
46	<b>P14B081</b>	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	S
47	<b>P18B175</b>	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	S
48	<b>P10B119</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
49	<b>P18B176</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
50	<b>P18B174</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
51	<b>P13B077</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
52	<b>P13B075</b>	S	pneumoniae	S	R	I	S	S	S
53	<b>P10B112</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	S	S
54	<b>P07B009*</b>	S	pneumoniae	S	S	I	S	S	S
56	<b>P10B084</b>	S	pneumoniae	S	R	S	I	S	S
57	<b>P07B138</b>	S	pneumoniae	S	R	R	R	S	S
58	<b>P10B068</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
59	<b>P10B113</b>	S	pneumoniae	R	S	S	R	S	S
60	<b>P18A333</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
61	<b>P08B189</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	R
63	<b>P05B047</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
64	<b>P05B074</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
69	<b>P05B090</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
70	<b>P05B036</b>	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S
71	<b>P13B127</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S

Tabellenanhang

72	<b>P05B103</b>	S	pneumoniae	S	R	R	R	S	S
73	<b>P05B071</b>	S	pneumoniae	R	R	S	I	R	S
74	<b>P13C056</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	I	S
75	<b>P15B019</b>	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	S
76	<b>P07B163</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
77	<b>P05B070</b>	S	pneumoniae	S1	I	R	S	S1	S
78	<b>P13B132</b>	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	R
79	<b>P05B126</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
81	<b>P02C135</b>	S	pneumoniae	S	S	I	S	S	S
82	<b>P10B100</b>	S	pneumoniae	S	I	S	I	S	S
83	<b>P10B099</b>	S	pneumoniae	S	R	S	I	S	S
84	<b>P13B129</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
85	<b>P08B075</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
86	<b>P13B135</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
87	<b>P18A546</b>	S	pneumoniae	S	S	I	I	S	S
88	<b>P13B131</b>	S	pneumoniae	S	I	I	S	S	S
89	<b>P17C106</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
91	<b>P09B053</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
92	<b>P13B134</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
93	<b>P13B125</b>	S	pneumoniae	S	I	S	I	S	S
94	<b>P13B133</b>	S	pneumoniae	S	S	I	S	S	S
95	<b>P13B144</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
96	<b>P13B148</b>	S	pneumoniae	S	R	I	I	S	S
97	<b>P13B147</b>	S	pneumoniae	S	I	R	R	S	S
98	<b>P13B150</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
99	<b>P13B141</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
100	<b>P10B096</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
102	<b>P08C061</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
103	<b>P06C029</b>	S	pneumoniae	R	S	S	R	R	S
104	<b>P08C079</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
105	<b>P08C022</b>	S	pneumoniae	R	R	S	R	S	S
106	<b>P10B030</b>	S	pneumoniae	R	R	R	R	R	S
107	<b>P10B032</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S

Tabellenanhang

108	<b>P08C077</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
109	<b>P09B086</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
111	<b>P05B104</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
112	<b>P08B022</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
113	<b>P07B089</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
114	<b>P05B130</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S
115	<b>P13B138</b>	S	pneumoniae	S	I	I	R	S	S
117	<b>P08A465</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
118	<b>P07A533*</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
119	<b>P05B077</b>	S	pneumoniae	R	R	R	R	R	S
121	<b>P05B059</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
122	<b>P08B084</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
123	<b>P05B099</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
126	<b>P05B098</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
127	<b>P08C091</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
128	<b>P05B095</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
130	<b>P05C014</b>	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S
132	<b>P13B080</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S
133	<b>P08B104</b>	S	pneumoniae	S	R	S	I	S	S
134	<b>P08A311</b>	S	pneumoniae	R	S	S	I	S	S
135	<b>P07A452</b>	S	pneumoniae	R	S	S	I	R	S
136	<b>P07B073</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
140	<b>P07B090</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
141	<b>P08B169</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
142	<b>P13B057</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
143	<b>P13A067</b>	S	pneumoniae	S	R	S	S	S	S
146	<b>P08B092</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	R
147	<b>P08B101</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
151	<b>P17B098</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
152	<b>P17A107</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
153	<b>P20A374</b>	S	pneumoniae	R	S	I	I	S	S
154	<b>P17B109</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S

Tabellenanhang

155	<b>P17B091</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
156	<b>P12B013</b>	S	pneumoniae	R	S	S	I	R	S
157	<b>P15B015</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
158	<b>P14B184</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
159	<b>P17B089</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
160	<b>P17B090</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
162	<b>P17B103</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
163	<b>P15B014</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
164	<b>P25B022</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
165	<b>P17A345</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
166	<b>P25B024</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
167	<b>P17B097</b>	S	pneumoniae	R	R	S	I	R	S
169	<b>P14B197</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
170	<b>P14B199</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
172	<b>P25B053</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
174	<b>P14B177</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
175	<b>P14B185</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
177	<b>P10B178</b>	S	pneumoniae	R	S	S	S	S	S
178	<b>P18B201</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
179	<b>P17B043</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
180	<b>P15B033</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S
181	<b>P25B054</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
182	<b>P12B019</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S
183	<b>P12B005</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
184	<b>P04B006</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
185	<b>P12A314</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
186	<b>P04B032</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
187	<b>P17A547</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
188	<b>P20B060</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
189	<b>P14B179</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
190	<b>P12B003</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
191	<b>P04B002</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S

Tabellenanhang

192	<b>P10C054</b>	S	pneumoniae	R	R	I	I	R	S
194	<b>P25B007</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
195	<b>P04B005</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
196	<b>P04B030</b>	S	pneumoniae	S	S	S	R	S	S
197	<b>P25B045</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
198	<b>P12A183</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
199	<b>P25B044</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
200	<b>P04B003</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
201	<b>P02C152</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	S	S
202	<b>P16A384</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
203	<b>P19B171</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
204	<b>P19B153</b>	S	pneumoniae	R	S	I	S	R	S
205	<b>P18B178</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
206	<b>P16A381</b>	S	pneumoniae	R	R	S	I	I	S
208	<b>P19B157</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	S	S
209	<b>P16A238</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
210	<b>P18B193</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	I	S
211	<b>P18B183</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
212	<b>P22A116</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
213	<b>P20B061</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
214	<b>P19A342</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
215	<b>P14B096</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
216	<b>P18B193</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
217	<b>P19B156</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
218	<b>P18B180</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
222	<b>P19B087</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
223	<b>P19B149</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
224	<b>P14B091</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
226	<b>P04B062</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	S	S
227	<b>P05A051</b>	S	pneumoniae	R	S	S	S	R	S

Tabellenanhang

228	<b>P02B189</b>	S	pneumoniae	S	S	I	S	S	S
230	<b>P10B158</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
231	<b>P04B047</b>	S	pneumoniae	R	S	S	S	S	S
232	<b>P06B133</b>	S	pneumoniae	R	S	S	S	R	S
234	<b>P05A090</b>	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S
235	<b>P19B071</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
236	<b>P04B054</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
237	<b>P02B029</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
239	<b>P19B150</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
240	<b>P05A311</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
241	<b>P04C044</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
243	<b>P10A526</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
244	<b>P15C035</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
245	<b>P16A302</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
246	<b>P16B036</b>	S	pneumoniae	R	S	S	S	S	S
247	<b>P05B025</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	S	S
248	<b>P19A006</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
249	<b>P08B022</b>	S	pneumoniae	R	R	I	S	R	S
250	<b>P06B158</b>	S	pneumoniae	R	I	R	R	R	S
251	<b>P04A246</b>	S	pneumoniae	R	I	I	S	R	S
252	<b>P04A506</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
254	<b>P04A217</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
255	<b>P03C201</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
256	<b>P02B082</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
257	<b>P03C172</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
258	<b>P06B097</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
260	<b>P06B070</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
261	<b>P02B077</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
262	<b>P06B032</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
264	<b>P14B138</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
265	<b>P02B099</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
266	<b>P03C028</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
268	<b>P04B044</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S

Tabellenanhang

270	<b>P03C103</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
271	<b>P03C102</b>	S	pneumoniae	R	R	R	R	R	S
272	<b>P03C180</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	I	R
273	<b>P02B087</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
274	<b>P02B065</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	R	S
275	<b>P03C156</b>	S	pneumoniae	R	S	I	S	R	S
276	<b>P14B151</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
277	<b>P06B071</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	S	S
279	<b>P03A177</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
280	<b>P02B187</b>	S	pneumoniae	R	R	I	I	R	S
281	<b>P19B162</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
282	<b>P02B097</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
283	<b>P02B098</b>	S	pneumoniae	R	R	S	S	R	S
284	<b>P03C210</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
285	<b>P04A553</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
286	<b>P06B072</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
287	<b>P02B091</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
288	<b>P04A545</b>	S	pneumoniae	R	S	R	R	R	S
289	<b>P04A291</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
291	<b>P06B154</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
292	<b>P04A270</b>	S	pneumoniae	R	S	R	R	R	S
293	<b>P06B098</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
294	<b>P04A397</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
296	<b>P04A387</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
299	<b>P06B066</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
300	<b>P19B194</b>	S	pneumoniae	S	I	R	R	S	S
302	<b>P02B201</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
303	<b>P01A260</b>	S	pneumoniae	S	S	I	I	S	S
304	<b>P02B199</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
305	<b>P02B196</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
306	<b>P01B062</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
307	<b>P03C202</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
308	<b>P02B181</b>	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S

Tabellenanhang

309	<b>P06B151</b>	S	pneumoniae	S	R	S	I	S	S
310	<b>P01B055</b>	S	pneumoniae	R	R	I	S	R	S
311	<b>P02B179</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
312	<b>P03C165</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
313	<b>P03C212</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
314	<b>P06B067</b>	S	pneumoniae	R	S	S	I	R	S
315	<b>P06B044</b>	S	pneumoniae	R	R	I	S	R	S
316	<b>P01B045</b>	S	pneumoniae	S	R	R	I	S	S
317	<b>P03A174</b>	S	pneumoniae	S	S	R	R	S	S
318	<b>P02B184</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
319	<b>P06B147</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	R	S
320	<b>P06A476</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
321	<b>P06A373</b>	S	pneumoniae	R	I	I	I	R	S
322	<b>P07A452</b>	S	pneumoniae	R	S	I	I	S	S
323	<b>P06A112</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
324	<b>P06B052</b>	S	pneumoniae	S	I	R	S	S	S
326	<b>P06A072</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
327	<b>P05C112</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
328	<b>P04B035</b>	S	pneumoniae	R	I	I	I	R	S
330	<b>P06B136</b>	S	pneumoniae	R	S	I	I	R	S
331	<b>P02B173</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	S	S
333	<b>P02B162</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
334	<b>P07B073</b>	S	pneumoniae	S	S	S	I	S	S
336	<b>P02B163</b>	S	pneumoniae	S	S	R	I	S	S
337	<b>P07B062</b>	S	pneumoniae	S	S	S	S	S	S
339	<b>P07B090</b>	S	pneumoniae	S	R	I	S	S	S
340	<b>P02B185</b>	S	pneumoniae	I	S	I	S	S	S
341	<b>P02B175</b>	S	pneumoniae	S	S	I	I	S	S
342	<b>P06C029</b>	S	pneumoniae	R	I	I	R	R	S
343	<b>P25B011</b>	S	pneumoniae	S	S	I	S	S	S
345	<b>P03C168</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
347	<b>P07B059</b>	S	pneumoniae	S	S	S	I	S	S
348	<b>P07B089</b>	S	pneumoniae	R	S	R	R	S	S
349	<b>P06B041</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S

Tabellenanhang

350	<b>P07A553</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
351	<b>P05A375</b>	S	pneumoniae	R	I	I	R	R	S
354	<b>P05A479</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
355	<b>P05A634</b>	S	pneumoniae	R	S	I	S	S	S
356	<b>P08A311</b>	S	pneumoniae	R	S	S	I	S	S
357	<b>P06B155</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
358	<b>P07B163</b>	S	pneumoniae	R	I	R	S	R	S
359	<b>P07B138</b>	S	pneumoniae	S	R	R	S	S	S
360	<b>P01A323</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	S	S
361	<b>P01B046</b>	S	pneumoniae	R	I	S	S	R	S
363	<b>P05A424</b>	S	pneumoniae	R	I	R	I	R	S
364	<b>P16B074</b>	S	pneumoniae	R!	S	R	S	R!	S
365	<b>P02B198</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
366	<b>P05A591</b>	S	pneumoniae	R	S	R	I	R	S
367	<b>P16A594</b>	S	pneumoniae	S	S	R	S	S	S
368	<b>P16B030</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
369	<b>P05A638</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
370	<b>P19A252</b>	S	pneumoniae	R	R	R	I	R	S
372	<b>P06B128</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
373	<b>P19A061</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	R	S
374	<b>P06B165</b>	S	pneumoniae	R	R	I	I	R	S
376	<b>P16B083</b>	S	pneumoniae	R	R	R	S	R	S
377	<b>P05A410</b>	S	pneumoniae	R	S	I	S	S	S
378	<b>P08A465</b>	S	pneumoniae	R	S	R	S	I	S
380	<b>P02B030</b>	S	pneumoniae	S	I	I	S	S	S

**Tabelle 6:**

MHK-Bestimmung der *S.pneumoniae* Isolate für Faropenem und Telithromycin in µg/ml

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
1	P02A301	<0,004	0,125
2	P17B062	0,25	0,016
3	P19B164	0,004	0,06
4	P17B060	0,0078	0,004
5	P14B043	0,004	<0,002
6	P18A113	0,25	0,03
7	P15B152	0,004	<0,002
8	P18A488	0,0156	0,06
9	P25B019	0,25	0,004
10	P17B053	0,125	0,0075
12	P17C137	0,0078	<0,002
13	P19B168	<0,004	0,0075
15	P17C180	<0,004	0,004
16	P16B054	0,0156	0,004
18	P18A364	0,25	0,004
19	P17B056	0,125	0,004
20	P17B051	0,0625	<0,002
21	P17B058	0,125	0,004
22	P14B068	0,0625	0,004
23	P17B061	0,25	0,03
24	P17B044	0,125	0,016
25	P13B152	0,0078	0,0075
26	P14B186	<0,004	0,016
27	P17C134	0,25	0,03
28	P15B026	<0,004	0,004
29	P13B153	<0,004	0,0075
30	P15C053	0,0156	<0,002
31	P17B045	0,125	0,06
32	P18B165	0,0078	0,0078

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
33	P19B163	<0,004	0,25
34	P10B181	<0,004	0,016
35	P18B187	<0,004	0,0075
37	P18B095	0,25	0,0075
38	P18B199	0,25	0,0075
39	P10B182	<0,004	0,016
40	P18B168	0,0156	0,0075
43	P17B151	<0,004	0,016
44	P25B012	<0,004	0,004
45	P10B168	<0,004	0,016
46	P14B081	<0,004	0,03
47	P18B175	<0,004	<0,002
48	P10B119	<0,004	0,125
49	P18B176	0,25	0,016
50	P18B174	0,0625	<0,002
51	P13B077	<0,004	<0,002
53	P10B112	<0,004	0,0075
56	P10B084	0,0078	0,004
58	P10B068	<0,004	<0,002
59	P10B113	<0,004	0,25
60	P18A333	<0,004	0,0075
61	P08B189	<0,004	0,004
63	P05B047	<0,004	0,0075
64	P05B074	0,25	0,016
69	P05B090	0,0078	0,06
70	P05B036	0,25	0,016
72	P05B103	0,125	<0,002
74	P13C056	<0,004	0,0075
75	P15B019	0,0156	0,004

Tabellenanhang

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
77	P05B070	0,25	<0,002
78	P13B132	<0,004	<0,002
79	P05B126	0,125	<0,002
81	P02C135	<0,004	<0,002
82	P10B100	<0,004	<0,002
83	P10B099	<0,004	<0,002
84	P13B129	<0,004	<0,002
85	P08B075	<0,004	<0,002
87	P18A546	<0,004	<0,002
89	P17C106	0,25	0,004
91	P09B053	0,125	<0,002
92	P13B134	<0,004	<0,002
93	P13B125	0,0078	<0,002
94	P13B133	0,0156	<0,002
95	P13B144	0,0156	0,016
96	P13B148	<0,004	<0,002
98	P13B150	<0,004	0,004
102	P08C061	0,03125	0,004
105	P08C022	0,0078	0,25
107	P10B032	0,125	<0,002
108	P08C077	<0,004	<0,002
111	P05B104	<0,004	0,004
114	P05B130	<0,004	<0,002
115	P13B138	0,003	<0,002
119	P05B077	0,125	0,06
121	P05B059	0,125	0,06
122	P08B084	<0,004	<0,002
123	P05B099	0,125	0,0075
126	P05B098	0,125	0,0075
127	P08C091	<0,004	>2
128	P05B095	0,25	0,0075
130	P05C014	0,25	<0,002
132	P13B080	0,003	0,008

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
133	P08B104	<0,004	0,008
141	P08B169	<0,004	0,0156
142	P13B057	0,0078	0,0156
143	P13A067	0,0078	0,03
146	P08B092	0,06	>2
147	P08B101	<0,004	0,008
151	P17B098	0,25	0,004
152	P17A107	0,25	0,03
153	P20A374	0,0078	0,25
154	P17B109	0,125	0,03
155	P17B091	0,0078	0,06
156	P12B013	0,0156	0,03
157	P15B015	0,25	0,0156
158	P14B184	0,03	0,03
159	P17B089	0,5	0,03
160	P17B090	<0,004	0,008
162	P17B103	<0,004	0,0156
163	P15B014	0,125	0,03
164	P25B022	0,0625	0,03
165	P17A345	0,25	0,004
166	P25B024	0,125	0,004
167	P17B097	0,0078	0,004
169	P14B197	0,004	0,008
170	P14B199	0,125	0,0156
172	P25B053	0,03	0,0156
174	P14B177	<0,004	0,008
175	P14B185	<0,004	0,008
177	P10B178	<0,004	0,06
178	P18B201	0,5	0,0156
179	P17B043	<0,004	0,0156
180	P15B033	0,06	0,004
181	P25B054	0,0156	0,0156
182	P12B019	<0,004	0,004

Tabellenanhang

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
183	P12B005	<0,004	0,008
184	P04B006	<0,004	0,004
185	P12A314	0,125	0,125
186	P04B032	0,125	0,125
187	P17A547	0,125	0,06
188	P20B060	<0,004	<0,002
189	P14B179	0,0078	0,125
190	P12B003	<0,004	0,125
191	P04B002	0,125	2
192	P10C054	<0,004	0,06
194	P25B007	0,125	0,06
195	P04B005	0,125	0,06
196	P04B030	0,125	>2
197	P25B045	<0,004	0,06
198	P12A183	<0,004	0,06
199	P25B044	0,0078	0,06
200	P04B003	0,25	>2
202	P16A384	0,125	0,06
205	P18B178	0,5	0,06
206	P16A381	0,06	0,125
208	P19B157	0,06	0,06
210	P18B193	0,06	0,06
211	P18B183	<0,004	0,06
212	P22A116	<0,004	0,06
213	P20B061	<0,004	0,06
214	P19A342	<0,004	0,125
215	P14B096	<0,004	0,125
216	P18B193	0,625	0,125
217	P19B156	<0,004	0,06
218	P18B180	0,125	0,06
222	P19B087	<0,004	0,125
223	P19B149	<0,004	0,25
224	P14B091	<0,004	0,03

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
226	P04B062	0,03125	0,06
227	P05A051	0,125	2
228	P02B189	<0,004	0,125
230	P10B158	0,0156	0,125
231	P04B047	0,125	2
232	P06B133	<0,004	0,125
234	P05A090	0,125	0,125
235	P19B071	<0,004	0,125
236	P04B054	<0,004	0,125
237	P02B029	<0,004	0,03
239	P19B150	<0,004	0,06
240	P05A311	0,0078	0,03
241	P04C044	0,5	0,06
243	P10A526	<0,004	0,125
244	P15C035	<0,004	0,125
245	P16A302	0,125	0,06
246	P16B036	0,0156	0,125
247	P05B025	0,0156	0,125
248	P19A006	0,125	0,125
250	P06B158	0,06	0,03
251	P04A246	0,06	0,06
252	P04A506	0,25	1
254	P04A217	0,125	0,125
255	P03C201	0,0078	0,06
256	P02B082	0,0078	0,03
257	P03C172	0,125	0,125
258	P06B097	0,0156	0,125
260	P06B070	0,25	2
261	P02B077	0,25	0,06
262	P06B032	0,25	0,06
264	P14B138	<0,004	0,125
265	P02B099	0,0156	0,06
266	P03C028	<0,004	0,125

Tabellenanhang

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
270	P03C103	0,25	0,125
271	P03C102	0,06	0,125
272	P03C180	0,06	0,125
273	P02B087	<0,004	0,125
275	P03C156	0,125	0,125
276	P14B151	0,125	0,5
277	P06B071	0,25	0,125
279	P03A177	0,06	0,125
280	P02B187	0,03	0,06
281	P19B162	0,06	0,03
282	P02B097	<0,004	0,06
283	P02B098	0,0078	0,125
284	P03C210	0,03	0,125
285	P04A553	0,125	0,125
286	P06B072	0,25	0,06
287	P02B091	0,125	0,004
288	P04A545	0,125	2
289	P04A291	0,25	0,004
292	P04A270	0,125	0,5
293	P06B098	0,125	0,016
296	P04A387	0,125	0,004
299	P06B066	0,0156	0,004
302	P02B201	0,125	0,0075
304	P02B199	0,25	0,004
305	P02B196	<0,004	0,004
306	P01B062	<0,004	0,016
307	P03C202	0,125	<0,002
308	P02B181	<0,004	0,0075
309	P06B151	<0,004	0,0075
310	P01B055	<0,004	<0,002
311	P02B179	0,0625	0,0075
312	P03C165	<0,004	0,016
313	P03C212	<0,004	0,0075

AN	Enare	Faropenem	Telithromycin
314	P06B067	<0,004	2
316	P01B045	<0,004	0,0075
317	P03A174	0,125	0,0075
318	P02B184	0,0156	0,0075
319	P06B147	0,0625	0,0075
320	P06A476	0,0078	0,016
321	P06A373	0,03125	2
323	P06A112	0,0156	0,03
324	P06B052	0,25	0,0075
326	P06A072	0,25	1
327	P05C112	0,125	0,03
328	P04B035	0,03125	0,03
330	P06B136	0,0625	>2
331	P02B173	<0,004	0,016
333	P02B162	0,25	0,03
336	P02B163	0,03125	0,0075
340	P02B185	0,03125	0,03
341	P02B175	<0,004	0,06
343	P25B011	<0,004	0,03
345	P03C168	0,125	0,0075
349	P06B041	0,125	0,0075
354	P05A479	0,03125	0,016
355	P05A634	<0,004	0,0075
357	P06B155	0,0625	0,03
360	P01A323	<0,004	0,03
361	P01B046	<0,004	0,06
363	P05A424	0,0625	2
365	P02B198	<0,004	0,0075
366	P05A591	0,0078	<0,002
367	P16A594	0,03	0,0075
368	P16B030	0,125	0,0075
369	P05A638	0,125	0,0075
370	P19A252	0,125	0,016

**Tabelle 8:**

MLS-Screening einiger ausgewählter Isolate mittels PCR (O=Optochin-, E=Erythromycin-, C=Clindamycin-Testblättchen; n=negativ, p=positiv; P=PCR-Arbeitsprotokoll)

AN	Keim	O	E	C	erm B		mef E	
<b>121</b>	<b>P05B059</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>P2-</b>	<b>n</b>	<b>P2-</b>	<b>n</b>
47	P18B175	S	S	S	P24-	n	P24-	n
44	P25B012	S	S	S	P24-	n	P24-	n
52	P13B075	S	S	S	P24-	n	P24-	n
136	P07B073	S	S	S	P24-	n	P24-	n
198	P12A183	S	S	S	P24-	n	P24-	n
296	P04A387	S	S	S	P29-	n	P29-	n
308	P02B181	S	S	S	P29-	n	P29-	n
318	P02B184	S	S	S	P29-	n	P29-	n
117	P08A465	S	S	S	P29-	n	P32-	n
336	P02B163	S	S	S	P30-	n	P30-	n
<b>377</b>	<b>P05A410</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>P34-</b>	<b>n</b>	<b>P33-</b>	<b>n</b>
59	P10B113	S	R	S	P2-	n	P2+	p
105	P08C022	S	R	S	P2-	n	P2+	p
109	P09B086	S	R	S	P2-	n	P2+	p
113	P07B089	S	R	S	P2-	n	P2+	p
134	P08A311	S	R	S	P2-	n	P2+	p
153	P20A374	S	R	S	P2-	n	P2+	p
177	P10B178	S	R	S	P7-	n	P4+	p
201	P02C152	S	R	S	P32-	n	P5+	p
223	P19B149	S	R	S	P34-	n	P26+	p
255	P03C201	S	S	S	P34-	n	P28+	p
322	P07A452	S	R	S	P29-	n	P32+	p
341	P02B175	S	S	S	P30-	n	P30+	p
343	P25B011	S	S	S	P30-	n	P30+	p
360	P01A323	S	R	S	P17-	n	P17+	p
2	P17B062	S	R	R	P1+	p	P1-	n
3	P19B164	S	R	R	P1+	p	P1-	n
4	P17B060	S	R	I	P11+	p	P11-	n
5	P14B043	S	R	S	P2+	p	P2-	n
6	P18A113	S	R	R	P6+	p	P3-	n
8	P18A488	S	R	R	P1+	p	P1-	n
12	P17C137	S	R	R	P1+	p	P1-	n
13	P19B168	S	R	R	P1+	p	P1-	n
14	P17C072	S	R	S	P11+	p	P11-	n
16	P16B054	S	R	S	P11+	p	P11-	n
23	P17B061	S	R	R	P1+	p	P1-	n
26	P14B186	S	R	R	P1+	p	P1-	n
27	P17C134	S	R	R	P1+	p	P1-	n

30	P15C053	S	R	R	P11+	p	P11-	n
31	P17B045	S	R	R	P1+	p	P1-	n
33	P19B163	S	R	R	P11+	p	P11-	n
34	P10B181	S	R	R	P11+	p	P11-	n
35	P18B187	S	R	R	P23+	p	P23-	n
39	P10B182	S	R	R	P1+	p	P1-	n
45	P10B168	S	R	R	P6+	p	P3-	n
48	P10B119	S	R	R	P7+	p	P3-	n
53	P10B112	S	R	S	P11+	p	P11-	n
69	P05B090	S	R	R	P7+	p	P3-	n
71	P13B127	S	R	I	P7+	p	P3-	n
73	P05B071	S	R	R	P7+	p	P3-	n
74	P13C056	S	R	I	P7+	p	P3-	n
76	P07B163	S	R	R	P6+	p	P3-	n
89	P17C106	S	R	R	P6+	p	P3-	n
95	P13B144	S	R	R	P7+	p	P3-	n
100	P10B096	S	R	R	P25+	p	P25-	n
103	P06C029	S	R	R	P21+	p	P3-	n
106	P10B030	S	R	R	P11+	p	P11-	n
111	P05B104	S	R	R	P23+	p	P23-	n
112	P08B022	S	R	R	P23+	p	P23-	n
114	P05B130	S	R	I	P21+	p	P3-	n
119	P05B077	S	R	R	P25+	p	P3-	n
128	P05B095	S	R	R	P10+	p	P3-	n
132	P13B080	S	R	I	P7+	p	P3-	n
141	P08B169	S	R	R	P10+	p	P3-	n
142	P13B057	S	R	R	P6+	p	P4-	n
146	P08B092	S	R	R	P6+	p	P4-	n
152	P17A107	S	R	R	P10+	p	P4-	n
155	P17B091	S	R	R	P10+	p	P4-	n
156	P12B013	S	R	R	P10+	p	P4-	n
158	P14B184	S	R	R	P10+	p	P4-	n
159	P17B089	S	R	R	P7+	p	P4-	n
162	P17B103	S	R	R	P10+	p	P4-	n
165	P17A345	S	R	R	P10+	p	P4-	n
167	P17B097	S	R	R	P21+	p	P4-	n
172	P25B053	S	R	R	P10+	p	P4-	n
178	P18B201	S	R	R	P23+	p	P23-	n
180	P15B033	S	R	I	P23+	p	P23-	n
181	P25B054	S	R	R	P7+	p	P4-	n
182	P12B019	S	R	I	P7+	p	P4-	n
186	P04B032	S	R	R	P12+	p	P4-	n
191	P04B002	S	R	R	P12+	p	P4-	n

192	P10C054	S	R	R	P12+	p	P4-	n
195	P04B005	S	R	R	P32+	p	P4-	n
200	P04B003	S	R	R	P6+	p	P5-	n
203	P19B171	S	R	R	P12+	p	P5-	n
204	P19B153	S	R	R	P12+	p	P5-	n
206	P16A381	S	R	I	P23+	p	P23-	n
208	P19B157	S	R	S	P27+	p	P33-	n
209	P16A238	S	R	R	P22+	p	P25-	n
210	P18B193	S	R	I	P22+	p	P25-	n
211	P18B183	S	R	R	P12+	p	P5-	n
214	P19A342	S	R	R	P22+	p	P25-	n
218	P18B180	S	R	R	P12+	p	P5-	n
226	P04B062	S	R	S	P26+	p	P33-	n
227	P05A051	S	R	R	P22+	p	P25-	n
230	P10B158	S	R	R	P12+	p	P5-	n
231	P04B047	S	R	S	P26+	p	P32-	n
232	P06B133	S	R	R	P12+	p	P5-	n
237	P02B029	S	R	R	P22+	p	P25-	n
241	P04C044	S	R	S	P22+	p	P25-	n
246	P16B036	S	R	S	P22+	p	P25-	n
247	P05B025	S	R	S	P21+	p	P21-	n
250	P06B158	S	R	R	P12+	p	P5-	n
251	P04A246	S	R	R	P12+	p	P5-	n
252	P04A506	S	R	R	P30+	p	P5-	n
254	P04A217	S	R	R	P7+	p	P5-	n
257	P03C172	S	R	S	P28+	p	P28-	n
260	P06B070	S	R	R	P7+	p	P5-	n
261	P02B077	S	R	R	P12+	p	P5-	n
265	P02B099	S	R	R	P28+	p	P28-	n
268	P04B044	S	R	R	P7+	p	P5-	n
270	P03C103	S	R	R	P12+	p	P5-	n
271	P03C102	S	R	R	P12+	p	P5-	n
272	P03C180	S	R	I	P8+	p	P8-	n
275	P03C156	S	R	R	P30+	p	P28-	n
277	P06B071	S	R	S	P34+	p	P28-	n
279	P03A177	S	R	R	P8+	p	P8-	n
280	P02B187	S	R	R	P8+	p	P8-	n
283	P02B098	S	R	R	P8+	p	P8-	n
284	P03C210	S	R	R	P8+	p	P8-	n
285	P04A553	S	R	R	P8+	p	P8-	n
286	P06B072	S	R	R	P34+	p	P28-	n
287	P02B091	S	R	R	P8+	p	P8-	n
288	P04A545	S	R	R	P8+	p	P8-	n

289	P04A291	S	R	R	P29+	p	P29-	n
292	P04A270	S	R	R	P9+	p	P9-	n
293	P06B098	S	R	R	P21+	p	P9-	n
294	P04A397	S	R	R	P21+	p	P9-	n
302	P02B201	S	R	R	P29+	p	P29-	n
305	P02B196	S	R	R	P21+	p	P9-	n
306	P01B062	S	R	R	P29+	p	P29-	n
307	P03C202	S	R	R	P21+	p	P9-	n
310	P01B055	S	R	R	P25+	p	P9-	n
312	P03C165	S	R	R	P9+	p	P9-	n
314	P06B067	S	R	R	P9+	p	P9-	n
315	P06B044	S	R	R	P29+	p	P29-	n
350	P07A553	S	R	R	P29+	p	P29-	n
50	P18B174	S	S	S	P24+	p	P24-	n
126	P05B098	S	S	S	P24+	p	P24-	n
196	P04B030	S	S	S	P24+	p	P24-	n
235	P19B071	S	S	S	P26+	p	P33-	n
236	P04B054	S	S	S	P30+	p	P33-	n
245	P16A302	S	S	S	P30+	p	P33-	n
258	P06B097	S	S	S	P30+	p	P28-	n
319	P06B147	S	S	R	P29+	p	P32-	n
320	P06A476	S	R	R	P29+	p	P32-	n
321	P06A373	S	R	R	P29+	p	P32-	n
326	P06A072	S	R	R	P29+	p	P32-	n
327	P05C112	S	R	R	P29+	p	P32-	n
328	P04B035	S	R	R	P29+	p	P32-	n
330	P06B136	S	R	R	P30+	p	P30-	n
331	P02B173	S	R	S	P30+	p	P30-	n
333	P02B162	S	R	R	P30+	p	P30-	n
340	P02B185	S	I	S	P30+	p	P30-	n
345	P03C168	S	R	R	P31+	p	P31-	n
349	P06B041	S	R	R	P31+	p	P31-	n
351	P05A375	S	R	R	P31+	p	P31-	n
354	P05A479	S	R	R	P17+	p	P17-	n
355	P05A634	S	R	S	P17+	p	P17-	n
357	P06B155	S	R	R	P17+	p	P17-	n
361	P01B046	S	R	R	P17+	p	P17-	n
363	P05A424	S	R	R	P17+	p	P17-	n
364	P16B074	S	R	R	P31+	p	P31-	n
366	P05A591	S	R	R	P31+	p	P31-	n
368	P16B030	S	R	R	P31+	p	P31-	n
369	P05A638	S	R	R	P31+	p	P31-	n
370	P19A252	S	R	R	P31+	p	P33-	n

---

372	P06B128	S	R	R	P31+	p	P33-	n
373	P19A061	S	R	R	P31+	p	P33-	n
374	P06B165	S	R	R	P31+	p	P33-	n
376	P16B083	S	R	R	P34+	p	P33-	n

**Tabelle 13 A:**

Gefundene Mutationen im DHPS-Gen (*sulA*) für *sul1/2*. Grau = neue Mutation

AN	Enare	58CGG	59CCG	60GGC	61AGT	62AGC	63TAT			64GTT
		Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr			Val
4	P17B060					62AGC	63AGT	AGC	TAT	64GTT
						Ser	Ser	Ser	Tyr	Val
10	P17B053					62AGC	63AAC	TAT		64GTT
						Ser	Asn	Tyr		Val
23	P17B61	58CGG	59CCT	60CGG	61CCG	62GAA	63AGC	AGC	TAT	64GTT
		Arg	Pro	Arg	Pro	Glu	Ser	Ser	Tyr	Val
91	P09B053					62AGT	63AGT	AGC	TAT	64GTT
						Ser	Ser	Ser	Ser	Val
98	P13B150					62AGC	63AGC	TAT		64GTT
						Ser	Ser	Tyr		Val
160	P17B098					62AGC	63TAT	AGC	TAT	64GTT
						Ser	Tyr	Ser	Tyr	Val
268	P04B44					62AGC	63AGC	TAT		64GTT
						Ser	Ser	Tyr		Val
289	P04A291					62AGT	63AGC	TAT		64GTT
						Ser	Ser	Tyr		Val
319	P06B147					62AGT	63AGT	TAT		64GTT
						Ser	Ser	Tyr		Val

**Tabelle 13 B:**

Gefundene Mutationen im DHPS-Gen (sulA) für sul3/4. grau=neue Mutation, dick umrandet=codierende Mutation; weiß: bereits in der Literatur beschriebene Mutation

AN	Enare	657 GAC-- >GAT	669 CTA-- >CCTC	678 AAG-- >AAA	696 CTC-- >CTT	702 GTG-- >GTT	714CGA-- >CGG
		219 Asp	223 Leu	226 Lys	232 Leu	234 Val	238 Arg
4	P17B060						
10	P17B053			X			X
23	P17B61				X		X
91	P09B053			X			X
98	P13B150						X
160	P17B098				X		
268	P04B44				X	X	
289	P04A291	X		X			X
319	P06B147		X				X

AN	Enare	729 ATC-- >ATT	732 CTA-- >CTT	735 GAG-- >GAA	738 GAG-- >GAA	740 AAT-- >AGT	744 GGT-- >GGG
		243 Ile	244 Leu	245 Glu	246 Glu	247 Asn-->Ser	248 Gly
4	P17B060		X	X	X	X	X
10	P17B053	X	X	X	X		
23	P17B61		X	X	X	X	
91	P09B053	X	X	X	X		
98	P13B150	X	X	X	X		
160	P17B098		X	X	X	X	
268	P04B44		X	X	X	X	
289	P04A291	X	X	X	X		
319	P06B147	X	X	X	X		

Tabellenanhang

AN	Enare	765 <u>ACA</u> -- > <u>ACC</u>	768 <u>GAG</u> -- > <u>GAA</u>	780 <u>CGC</u> -- > <u>CGA</u>	786 <u>CGG</u> -- > <u>CGA</u>	789 <u>GAC</u> -- > <u>GAT</u>	792 <u>ACG</u> -- > <u>ACA</u>
		255 Thr	256 Glu	260 Arg	262 Arg	263 Asp	264 Thr
4	P17B060						
10	P17B053				X	X	
23	P17B61	X	X		X	X	X
91	P09B053		X		X	X	
98	P13B150		X		X	X	
160	P17B098			X	X	X	X
268	P04B44		X	X	X	X	
289	P04A291		X		X	X	
319	P06B147		X		X	X	

AN	Enare	810 <u>ACT</u> -- > <u>ACC</u>	816 <u>ATC</u> -- > <u>ATT</u>	820 <u>GCA</u> -- > <u>ACA</u>	821/2 <u>GCA</u> -- > <u>GTG</u>	822 <u>GCA</u> -- > <u>GCG</u>	825 <u>AGA</u> -- > <u>AGG</u>
		270 Thr	272 Ile	274 Ala -->Thr	274 Ala -->Val	274 Ala	275 Arg
4	P17B060						
10	P17B053					X	
23	P17B61	X	X	X			
91	P09B053					X	
98	P13B150				X		
160	P17B098					X	X
268	P04B44					X	
289	P04A291					X	
319	P06B147						

Tabellenanhang

AN	Enare	834 <u>GTA</u> -- > <u>GTG</u>	855 <u>GAC</u> -- > <u>GAT</u>	860 <u>GCT</u> -- > <u>GTT</u>	891 <u>TCT</u> -- > <u>TCC</u>	894 <u>GCC</u> -- > <u>GCT</u>
		278 Val	285 Asp	287 Ala--> Val	297 Ser	298 Ala
4	P17B060					
10	P17B053	X				
23	P17B61				X	
91	P09B053	X	X			
98	P13B150	X	X		X	X
160	P17B098		X		X	X
268	P04B44	X			X	
289	P04A291	X	X	X	X	
319	P06B147					

**Tabelle 13 C:**

Mutationen nach Sequenzierung für DHFR Gen (tri1/2)

AN	Enare	288 ATC→CTC 100Ile→Leu	288ATC→CTT 100Ile→Leu	288ATC→ATC 100Ile→Leu
4	P17B060	x		
10	P17B053	x		
23	P17B61			
91	P09B053		x	
98	P13B150			x
160	P17B098	x		
268	P04B44		x	
289	P04A291		x	
319	P06B147	x		

## Danksagung

Zuallererst und in besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Kollegen Andreas Beeck bedanken, der mit mir zusammen sowohl die erfreulichen als auch die enttäuschenden Momente während unserer gemeinsamen Arbeit tapfer durchgestanden hat. Dies wird für immer eine unvergeßliche Zeit bleiben.

Ein ganz besonderer Dank gebührt natürlich auch meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz, der die Bedeutung des Wortes Betreuung stets sehr ernst genommen und meine Arbeit mit großem Engagement und viel Leidenschaft mit mir zu einem erfolgreichen Abschluß geführt hat.

Bei Frau Dr. Sybille Scheuring und Herrn PD Dr. Karl Köhrer aus dem BMFZ (=Biologisches Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) und ihren Mitarbeitern bedanke ich mich sehr für die ausgesprochen unkomplizierte Zusammenarbeit und die jederzeit freundliche Unterstützung.

Bei Frau Prof. Dr. med. Helga Idel bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Mechthild Boos und Susanne Mayer möchte ich für ihre große Unterstützung einen herzlichen Dank sagen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Marzena Czarna sagen für Ihre stets bedingungslose Hilfsbereitschaft.

Für ihren fachlichen Rat und ihre unermüdliche Hilfestellung danke ich sehr:

Herrn Ad C. Fluit und Herrn Jan Verhoef (Eijkman-Winkler Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Universität Utrecht, Niederlande) und

Herrn Christof von Eiff (Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster).

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeitern der Nährbodenküche, die an dem raschen Fortschritt unserer Bemühungen nicht unerheblich beteiligt waren.

## Lebenslauf

**Name:** Mirella Hellena Perdikouli  
**Geburtsdatum:** 16.12.1974  
**Geburtsort:** Düsseldorf  
**Eltern:** Alexandra Perdikouli, geb. Hodzic  
Elias Perdikouli

**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulbildung:** 1980-1984  
Carl-Sonnenschein Grundschule in Düsseldorf  
1985-1992  
St. Ursula Gymnasium in Düsseldorf  
1992-1994  
Gymnasium Am Poth in Düsseldorf

**Schulabschluß:** Abitur (1994)

### **Studium:**

1994 Krankenpflegepraktikum, Evangelisches Krankenhaus in Düsseldorf  
1995 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
Herbst 1998 Ärztliche Vorprüfung  
Herbst 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1999 Beginn der Promotionarbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-  
HeineUniversität Düsseldorf über Resistenzentwicklung und Resistenz-  
mechanismen *Gram-positiver* Kokken unter der Leitung von PD Dr.  
med. Franz-Josef Schmitz  
Herbst 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2001 – 2002 Praktisches Jahr an der Heinrich-HeineUniversität Düsseldorf  
November 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf  
Seit 02/2003 Ärztin im Praktikum im St. Elisabeth Krankenhaus, Grevenbroich  
Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Chefarzt Dr. E. Harms

**Famulaturen:**

07/99	Institut für Mikrobiologie Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. U. Hadding
02/00	Abteilung für Innere Medizin Evangelisches Krankenhaus in Düsseldorf, CA Prof. Dr. Neuhaus
03/00	Abteilung für Pädiatrie Evangelisches Krankenhaus in Düsseldorf, CA Prof. Dr. Schweitzer-Kranz
08/00	Neurochirurgische Klinik Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, CA Univ. Prof. Dr. W. Bock
03/01	Dermatologische Praxis Dr.med. Hubbes, Düsseldorf

**Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf:**

<i>Erstes Tertial</i>	Frauenklinik CA Prof H. G. Dr. Bender
<i>Zweites Tertial</i>	Klinik für Allgemeine und Unfallchirurgie CA Univ. Prof. Dr. H. D. Röher  Klinik für Kinderchirurgie Komm.-Direktor: Univ. Prof. Dr. H. D. Röher
<i>Drittes Tertial</i>	Klinik für Innere Medizin (Gastroenterologie) CA Prof. Dr. Häussinger  Klinik für Innere Medizin (Kardiologie) CA Prof. Dr. Strauer

<b>Praktika:</b>	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Krankenhaus Gerresheim in Düsseldorf, CA Prof. Dr. Albrecht  Praxis für Allgemeinmedizin, Frau Dr. med. Müller, Düsseldorf
------------------	--

<b>Fortbildungen:</b>	Sonographie-Kurs, Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  Kurs für CT-Diagnostik, Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-----------------------	--

**Molekulare Untersuchung von Makrolid-, Tetrazyklin-, Chinolon- und Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Resistenzmechanismen in 1191 klinischen europäischen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae***

Einleitung: *Streptococcus pneumoniae* ist einer der häufigsten Krankheitserreger beim Menschen. In den letzten Jahren hat die Resistenz gegenüber Penicillin G sowie anderen Antibiotika weltweit deutlich zugenommen. Die vorliegende Studie umfasste 1191 (*Streptococcus*-) Isolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des SENTRY Überwachungsprogramms gesammelt wurden. Die gesammelten Isolate wurden auf ihre MHK-Werte und *in-vitro* Aktivitäten mit verschiedenen Substanzen getestet. Bei den resistenten Isolaten wurden die klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen molekular-epidemiologisch untersucht. Diese Arbeit soll somit einen Überblick über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und die *in-vitro* Aktivität verschiedener Substanzen bei klinischen Pneumokokken-Isolaten aus den Jahren 1997-1999 geben und auf mögliche Tendenzen zur Multiresistenz hinweisen.

Methoden: Die untersuchten Isolate entstammten der SENTRY-Studie. Sie wurden von Patienten mit positiven Blutkulturen sowie mit ambulant bzw. nosokomial erworbenen Pneumonien gewonnen. Die Identifikation der Pneumokokkenstämme erfolgte anhand des MicroScan Walk Away 96 Systems. Zusätzlich erfolgte die Prüfung auf Optochinempfindlichkeit mittels Testblättchen. Die Verifizierung der Resistenzlage der einzelnen Isolate erfolgte mittels Agardiffusionstests. Die Messung der spezifischen MHK-Werte wurde nach dem Mikrotiterverfahren in Müller-Hinton-Medium durchgeführt. Die Zellkonzentration konnte durch Messung der optischen Dichte kontrolliert werden. Die molekulare Charakterisierung wurde mit Hilfe der PCR-Methode bzw. Fällung und anschließender Sequenzierung gesichert.

Ergebnisse: Bei 73% der Makrolid-resistenten Erreger ließ sich das erm(B)-Gen nachweisen, lediglich 27% wiesen das mef(E)-Gen auf. Mutationen in 23 S rRNA und/oder den ribosomalen Proteinen L4 und L22 konnten wir nicht nachweisen. Die Tetrazyklin-Resistenz war nur mit dem tet(M)-Gen assoziiert. Alle Trimethoprim-resistenten Isolate wiesen eine Ile100→Leu Alteration in der Dihydrofolsäurereductase auf, während die Sulfonamid-Resistenz auf Duplikationen im Dihydropteroatsynthetase-Gen *sulA* zurückgeführt werden kann. Bei den vier Isolaten mit erhöhten Levofloxacin-MHK-Werten ließen sich neben den klassischen Alterationen in *GyrA* (Ser81→Phe oder Tyr) und *ParC* (Ser79→Phe und Asp83→Asn) auch Efflux-Aktivitäten nachweisen.

Diskussion: Sowohl die *in-vitro* als auch die auf molekularer Ebene ermittelten Daten unserer Studie zeigen eine durchaus als dramatisch einzustufende Entwicklung der (Multi-)Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* gegenüber verschiedenen Antibiotika bzw. deren Kombinationen. Die klassischen Mutationen bezüglich der einzelnen Substanzen konnten wir bestätigen. Mutationen im tet(O)-Gen und in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 konnten wir nicht finden, so daß wir davon ausgehen, daß diese Mutationen zurzeit keine klinische Relevanz haben. Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung, die sich auch in unseren Ergebnissen widerspiegelt, wird es wahrscheinlich auch in Deutschland bzw. in anderen europäischen Ländern in Zukunft zu einem deutlichen Anstieg der resistenten Pneumokokken kommen. Zur Erklärung dieses Phänomens kann der Prozeß der Kreuzresistenz bzw. die klonale Ausbreitung herangezogen werden, was die unterschiedliche geographische Verteilung einiger Gene erklären würde. Eine weitere mögliche Erklärung für die Dominanz einiger Gene, wie z.B. die des tet(M) Gens, wäre das gemeinsame Vorkommen der beiden Gene erm(B) und tet(M) auf demselben Transposon Tn 1545. Im Hinblick auf die aktuelle Literatur wird es in Zukunft interessant sein, den Selektionsdruck bei wohlmöglich gesteigertem Antibiotikaverbrauch, insbesondere neuerer Substanzen wie z.B. den Ketoliden zu verfolgen.