

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer

Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae*,
S. pyogenes und anderer Streptokokken-Spezies gegenüber
Fluorchinolonen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Ansgar Alexander Fischer

2003

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab

Referent: Prof. Dr. Franz-Josef Schmitz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Helga Idel

WIDMUNG

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	7
1.1 Bakterien	7
1.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
1.1.2 Viridans-Streptokokken	7
1.1.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	8
1.2 Fluorchinolone	9
1.2.1 Einteilung und Struktur der Fluorchinolone	9
1.2.2 Zielstrukturen der Fluorchinolone.....	12
1.2.3 Wirkungsweise der Chinolone	13
1.2.4 Resistenz gegenüber Chinolonen	14
1.3 Epidemiologie der Antibiotikaresistenz	16
1.4 Fragestellung der Promotionsschrift.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Bakterien	19
2.1.2 Chemikalien	19
2.1.3 Enzyme	20
2.1.4 Antibiotika	20
2.1.5 Fertigkits.....	20
2.1.6 Laborgeräte	21
2.1.7 Pufferlösungen.....	21
2.1.8 Plastikeinwegartikel.....	21
2.1.9 Nährmedien	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Bakterienidentifizierung	22
2.2.2 Anzucht der Bakterien	22
2.2.3 Aufbewahrung der Bakterien.....	23
2.2.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK).....	23
2.2.5 Reserpin-Test	24
2.2.6 Mutantenselektion	24
2.2.7 Nukleinsäuren (Primer)	26
2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.2.9 Gelelektrophorese	29
2.2.10 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	30

2.2.11 Sequenzierung	31
3. ERGEBNISSE	35
3.1 Epidemiologischer Überblick über die Fluorchinolon-Resistenz klinischer Isolate und die zu Grunde liegenden Mutationsmuster	35
3.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
3.1.2 Viridans-Streptokokken	36
3.2 <i>In vitro</i> -Resistenzentwicklung bei Fluorchinolon-empfindlichen Stämmen	37
3.2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
3.2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	44
3.3 <i>In vitro</i> -Resistenzentwicklung bei <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Isolaten mit verminderter Ciprofloxacin-Empfindlichkeit	50
4. DISKUSSION	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS	62
7. ANHANG	74
7.1 Tabellenverzeichnis	74
7.2 Abbildungsverzeichnis	75
7.3 Danksagung	77
7.4 Lebenslauf	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinucleotid-Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
k	Kilo
KBE	Kolonie bildende Einheit
l	Liter
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
n	Nano
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
QRDR	Quinolone resistance-determining region
RNS	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
s	Sekunde
STSS	Streptococcal toxic shock-like syndrome
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptic soy bouillon (Trypton-Soja-Bouillon)

U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin
D	Asp	Asparaginsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
N	Asn	Asparagin
S	Ser	Serin
Y	Tyr	Tyrosin

1 EINLEITUNG

1.1 BAKTERIEN

1.1.1 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Die Art *Streptococcus pneumoniae*, auch als Pneumokokken bezeichnet, gehört zu der Familie der *Streptococcaceae*. Es ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium, welches am besten auf komplexen Nährböden unter 5 – 10% CO₂-Spannung wächst und auf Agar unter Zusatz von Schafblut eine α -Hämolyse (Vergrünung) aufweist. Darunter versteht man den unvollständigen Abbau des Hämoglobins zu Biliverdin, katalysiert durch das intrazelluläre Enzym Pneumolysin, welches bei der Autolyse der Zellen freigesetzt wird. Die Autolyse ihrerseits ist bedingt durch die Muramidase, die durch Optochin (Äthyl-Hydrocuprein) aktiviert werden kann. Durch ihre Optochinempfindlichkeit können Pneumokokken von den übrigen vergrünenden Streptokokken (s. u.) unterschieden werden ^{11, 41}.

Streptococcus pneumoniae gilt als Hauptursache für die ambulant erworbene Pneumonie, die sich heute vorwiegend als Bronchopneumonie manifestiert. Weitere typische Pneumokokkeninfektionen sind die Sinusitis sowie, vor allem bei Kindern, die Meningitis und die rezidivierende Otitis media ^{11, 41, 52}. Für lange Zeit wurde die Virulenz von *Streptococcus pneumoniae* vor allem der anti-phagozytotisch wirksamen Kapsel zugeschrieben. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass verschiedene andere Faktoren zur Virulenz beitragen, darunter das Pneumolysin (s. o.), das auf alle eukaryotischen Zellen lytisch wirkt, und eine Anzahl von Cholin-bindenden Oberflächenproteinen. Die am häufigsten vorkommenden sind CbpA und PsaA, welche als Oberflächenadhäsine wirken, sowie Autolysin LytA. Dieses bewirkt die Freisetzung von Lipoteichon- und Teichonsäuren, die Mediatoren der Immunantwort des Wirtes sind ⁹⁴.

1.1.2 VIRIDANS-STREPTOKOKKEN

Als Viridans-Streptokokken werden verschiedene α -hämolytische (vergrünende) Streptokokken-Spezies mit Ausnahme der Pneumokokken bezeichnet. Obwohl die Zusammenfassung dieser Gruppe von fakultativ-anaerob wachsenden Streptokokken nicht den heutigen taxonomischen Erkenntnissen genügt, wird die Bezeichnung in dieser Arbeit angeführt, da sie sowohl im klinischen Gebrauch als auch in neueren wissenschaftlichen Arbeiten Verwendung findet. In die vorliegende Untersuchung wurden die beiden Spezies *Streptococcus mitis* und *Streptococcus sanguis* einbezogen.

Die Viridans-Streptokokken gehören zur physiologischen Flora der Mundhöhle, des Oropharynx und des oberen Gastrointestinaltraktes. Die orale Mukosa ist die häufigste Eintrittspforte. Ihre Rolle bei der infektiösen Endokarditis und der Entstehung der Karies sind seit langem bekannt, sie können jedoch auch Infektionen des Respirationstraktes und der Haut sowie Meningitiden hervorrufen⁵⁵. In letzter Zeit gewinnen die vergrünenden Streptokokken immer mehr an Bedeutung als Ursache für die nosokomiale Bakteriämie, vor allem bei neutropenischen Karzinompatienten⁸⁴. Eine Komplikation der Sepsis ist das so genannte „alpha-streptococcal shock syndrome“, das sich klinisch vor allem als „acute respiratory distress syndrome (ARDS)“ äußert⁹². Die mittlere Mortalität der von Viridans-Streptokokken verursachten Sepsis beträgt ungefähr 10%⁹¹.

1.1.3 *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Einige Streptokokken sind in der Lage, das Hämoglobin des Blutagars mit Hilfe bestimmter Hämolytine vollständig abzubauen. Dieser Vorgang wird als β -Hämolyse bezeichnet. Sie können nach Rebecca Lancefield aufgrund eines C-Polysaccharids ihrer Wand weiter in verschiedene Serogruppen eingeteilt werden. Die β -hämolytischen Streptokokken der Serogruppe A werden auch als *Streptococcus pyogenes* bzw. A-Streptokokken bezeichnet⁴¹. *S. pyogenes* verursacht die meisten der Streptokokken-Infektionen beim Menschen, vor allem im Bereich der oberen Atemwege und der Haut. Typische Erkrankungen sind z. B. die akute eitrige Pharyngitis, der Scharlach, das Erysipel und die Impetigo contagiosa¹¹. Wichtige Spätfolgen von *S. pyogenes*-Infektionen sind das akute rheumatische Fieber und die akute Glomerulonephritis. Seit der Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts ist ein bemerkenswerter Anstieg schwerer durch A-Streptokokken verursachter Erkrankungen festzustellen, die vor allem junge und gesunde Personen nach kleineren lokalen Traumata betrifft. Sie gehen mit Weichgewebsinfektionen, Schock, Sepsis, Multiorganversagen und einer hohen Mortalität einher und werden als „Streptococcal toxic shock-like syndrome (STSS)“ bezeichnet¹³.

Um sich im Wirtsorganismus Mensch überhaupt vermehren zu können, muss sich das Bakterium gegen die Phagozytose schützen. Dies gelingt *S. pyogenes* durch das so genannte M-Protein, welches den Komplementfaktor H bindet und so die Aktivierung des alternativen Komplementweges verhindert¹⁹. Das M-Protein gilt als Hauptvirulenz-Faktor der A-Streptokokken und erlaubt eine Untergliederung in verschiedene Serotypen. Weitere Virulenzfaktoren sind extrazellulär ausgeschiedene Produkte, darunter die Hämolytine Streptolysin O und S, die Enzyme Hyaluronidase, Streptokinase sowie verschiedene DNAsen²⁹.

1.2 FLUORCHINOLONE

1.2.1 EINTEILUNG UND STRUKTUR DER FLUORCHINOLONE

1962 wurde von Lesher *et al.* als erste Substanz einer neuen antibakteriell wirksamen Stoffgruppe die Nalidixinsäure synthetisiert ⁶¹. Nahe verwandt ist die 4-Chinolinsäure mit einem C-Atom an Position 8, von der die meisten Chinolone abgeleitet werden. Beide Substanzen sind durch eine 4-Oxo-3-Carbonsäuregruppierung charakterisiert, auf welche die antibakterielle Wirkung zurückgeht. Die modernen Chinolone haben an C-6 ein Fluoratom als Substituenten, weshalb sie auch als Fluorchinolone bezeichnet werden. Die Fluorination bewirkt eine erhebliche Steigerung der antibakteriellen Wirksamkeit im Vergleich zu den nicht-fluorierten Vertretern, welche wegen der deutlich schwächeren Aktivität nicht mehr eingesetzt werden sollten ⁷⁰.

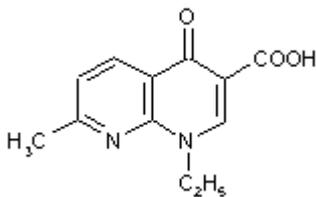


Abbildung 1: Strukturformel der Nalidixinsäure

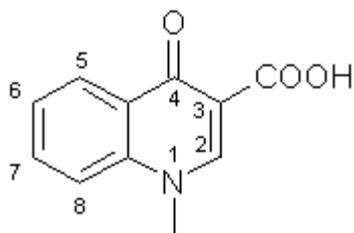


Abbildung 2: Strukturformel der 4-Chinolinsäure

Mittlerweile haben sich die Fluorchinolone zu einer großen Substanzgruppe entwickelt. Die in Deutschland erhältlichen Vertreter können gemäß eines Vorschlages einer Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie in vier Gruppen zusammengefasst werden. Diese Einteilung orientiert sich an dem antibakteriellen Spektrum, der Pharmakokinetik und den Indikationen ⁷⁰.

GRUPPE	DEFINITION	BEISPIELE
I	Orale Fluorchinolone mit im wesentlichen auf Harnwegsinfektionen eingeschränkter Indikation	Norfloxacin Pefloxacin
II	Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation	Ofloxacin Ciprofloxacin
III	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger	Levofloxacin Sparfloxacin [#]
IV	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger sowie gegen Anaerobier	Gatifloxacin Moxifloxacin Clinafloxacin [#] Gemifloxacin* Trovafoxacin

Tabelle 1: Einteilung der Fluorchinolone nach Gruppen (modifiziert nach einem Vorschlag einer Expertengruppe der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie ⁷⁰⁾

* Substanzen, die sich noch in klinischer Prüfung (Phase III) befinden bzw. zur Zulassung eingereicht sind.

Nicht mehr im Handel

Die Gruppen I und II werden unterschieden, da die Vertreter der ersten Gruppe nur in oraler Form und im Wesentlichen zur Behandlung von Harnwegsinfekten verabreicht werden. Die Präparate der Gruppe II sind mit einer Ausnahme sowohl oral als auch parenteral einsetzbar und können neben oben genannter Indikation auch bei Infektionen der Atemwege (vor allem verursacht durch gramnegative Erreger), der Haut, Weichteile und Knochen sowie bei systemischen Infektionen bis hin zur Sepsis gegeben werden. Die Hauptwirkung liegt jedoch im gramnegativen Bereich. Ciprofloxacin (Ciprobay[®]), das 1987 in den USA eingeführt wurde, ist das meist genutzte Präparat dieser Gruppe.

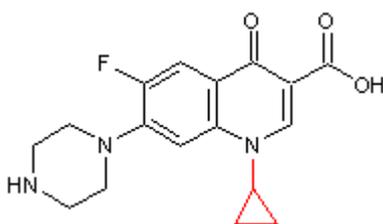


Abbildung 3: Strukturformel von Ciprofloxacin

Die Gruppen III und IV unterscheiden sich von den vorgenannten durch die verbesserte Wirksamkeit gegen grampositive und atypische Erreger. Dies beruht u. a. auf

der Substitution durch Fluor (Sparfloxacin), Chlor (Clinafloxacin) oder eine Methoxygruppe (Gatifloxacin, Moxifloxacin) an C-8, wobei auch die Aktivität im gramnegativen Bereich noch gesteigert werden konnte. Gerade die Gruppe IV zeichnet sich durch eine besonders gute Aktivität gegen Pneumokokken aus. Die Halogenierung am C-8-Atom steigert jedoch auch die Phototoxizität, weshalb Sparfloxacin und Clinafloxacin vom Markt genommen werden mussten²⁵.

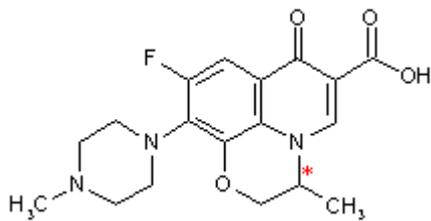


Abbildung 4: Strukturformel von Levofloxacin

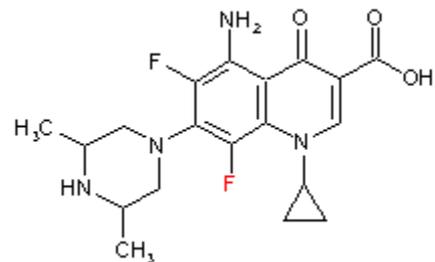


Abbildung 5: Strukturformel von Sparfloxacin

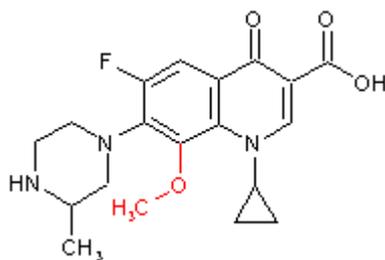


Abbildung 6: Strukturformel von Gatifloxacin

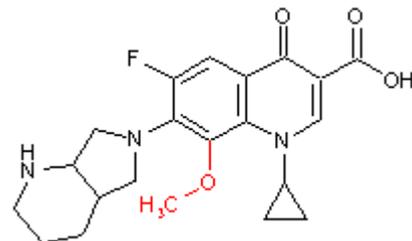


Abbildung 7: Strukturformel von Moxifloxacin

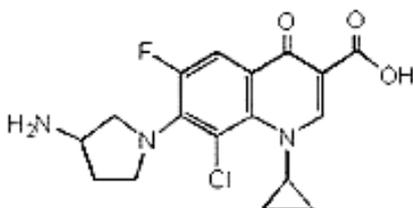


Abbildung 8: Strukturformel von Clinafloxacin

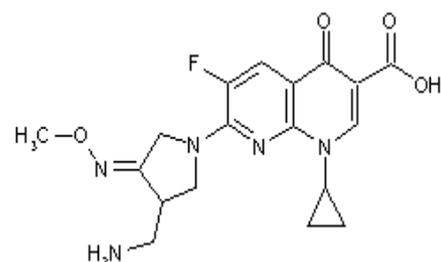


Abbildung 9: Strukturformel von Gemifloxacin

1.2.2 ZIELSTRUKTUREN DER FLUORCHINOLONE

Die Zielstrukturen der Fluorchinolone sind DNS-Gyrase und Topoisomerase IV, zwei bakterielle Enzyme des Typs Topoisomerase II ⁶¹. Die Gyrase wurde 1976 von Gellert *et al.* entdeckt, die Topoisomerase IV 1990 von Kato *et al.* ^{35, 60}. Sie sind essentiell für Zellwachstum und Zellvermehrung, da sie eine wichtige Rolle bei der Transkription und Translation der DNS sowie bei der Trennung von Tochterchromosomen spielen. Die Kenntnisse zur physiologischen Aktivität der Enzyme stammen größtenteils von Untersuchungen bei *E. coli* ^{85, 102}.

Der DNS-Gyrase kommt die Aufgabe zu, positive Überspiralisierung (das so genannte „positive supercoiling“) aus dem Bakterienchromosom zu entfernen, da diese ein Hindernis für das Fortschreiten der Replikationsgabel bei der DNS- bzw. RNS-Synthese darstellt. Des Weiteren ist die DNS-Gyrase als einziges bisher bekanntes Enzym in der Lage, direkt negative Superhelices in die relaxierte DNS einzuführen und ermöglicht es dem Bakterienchromosom so, in der Zelle überhaupt Platz zu finden ^{42,}

⁴⁵. Außerdem wird die DNS durch die Überspiralisierung in einen energiereicheren Zustand überführt, wodurch das Chromosom für alle Prozesse aktiviert wird, während derer die Einzelstränge getrennt werden. Die Aktivität der Gyrase wird durch das Verhältnis von ATP zu ADP beeinflusst, welches seinerseits von der Änderung des extrazellulären Milieus (Ionenkonzentration, Sauerstoffspannung, Temperatur und pH-Wert) abhängt. So kann die Gyrase in gewissem Umfang auf die Umwelt reagieren.

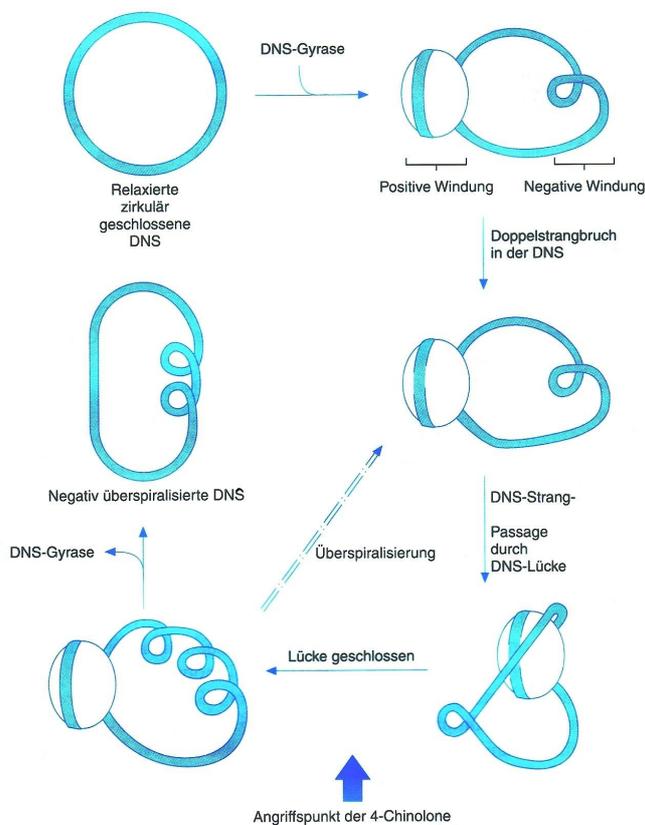


Abbildung 10: Funktion der DNS-Gyrase (modifiziert nach Heisig ⁴²)

Die Topoisomerase IV dient wie die Gyrase der Beseitigung von positiven Superhelices. Im Gegensatz zu dieser wickelt sie die DNS jedoch nicht um sich selbst, weshalb sie vor allem der intermolekularen und nicht der intramolekularen Strangpassage dient. Daher ist ihre Hauptaufgabe die Trennung von Tochterchromosomen nach der Transkription, die so genannte Decatenierung¹⁰². Das Enzym Gyrase zeigt auch eine decatenierende Aktivität, jedoch nur 1% der von Topoisomerase IV und nur nach vollständiger Transkription eines Chromosoms, während Topoisomerase IV die Tochterchromosomen auch nach unvollständiger Transkription zu trennen vermag⁸⁰.

Beide Enzyme bestehen aus je zwei Untereinheiten, sie besitzen also die tetramere Struktur A₂B₂. Bei *E. coli* ist die A-Untereinheit ein Protein mit der Molekularmasse von 97 kDa. Das C-terminale Fragment ist für die kovalente Bindung an das DNS-Molekül sowie die Interaktion mit Chinolonen zuständig, das N-terminale Fragment dient der Stabilisierung des Proteins. Die 90 kDa schwere B-Untereinheit beherbergt Regionen für die Interaktion mit ATP sowie mit der A-Untereinheit⁸⁵. Der Mechanismus der Enzymwirkung wird wie folgt angenommen: Nachdem ein Doppelstrangbruch in die DNS eingeführt worden ist, binden die freien 5'-OH-Gruppen über eine Phosphatesterbindung kovalent an je einen Tyrosin-Rest an Position 122 der A-Untereinheit. Ein zweiter DNS-Abschnitt aus einem entfernt liegenden Chromosomenabschnitt (Gyrase) bzw. das Tochterchromosom (Topoisomerase IV) wird aufgrund einer Konformationsänderung durch die entstandene Lücke geführt, welche daraufhin wieder versiegelt wird. Durch ATP-Hydrolyse wird das Enzym für die nächste Katalyse wiederhergestellt^{28, 42, 45}.

Für die A-Untereinheit der DNS-Gyrase kodiert das *gyrA*-Gen, für die B-Untereinheit ist es *gyrB*. Die genetische Information für die Topoisomerase IV stammt aus homologen Genabschnitten, die entsprechend *parC* und *parE* genannt werden. Diese Genabschnitte sind bei vielen Bakterienarten hochkonserviert, zeigen jedoch bei den Viridans-Streptokokken eine erstaunlich hohe Variabilität. Dies wird von einigen Autoren als Indiz dafür angesehen, dass diese Gruppe von Bakterien möglicherweise nicht ausreichend klassifiziert ist^{31, 37}.

1.2.3 WIRKUNGSWEISE DER CHINOLONE

Die Chinolone beeinträchtigen die Bakterien auf mindestens zwei verschiedene Arten. Die Bindung des Chemotherapeutikums an das Enzym Gyrase verschlechtert dessen Fähigkeit, einen Komplex mit der DNS einzugehen. Im Falle der Topoisomerase wird wahrscheinlich die hydrolytische Funktion der B-Untereinheit gestört. In beiden Fällen resultiert eine Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität und so eine

Hemmung der Bakterienvermehrung durch gestörte DNS-Synthese und Verteilung auf die Tochterzellen. Neben dieser bakteriostatischen Wirkkomponente resultiert aus der Interaktion des Chinolons mit dem DNS-Enzym-Verband die Stabilisierung des so genannten „spaltbaren Komplexes (cleavable complex),“ der ein reversibles intermediäres Produkt der Enzymaktivität darstellt. Aus diesem werden in der Folge Doppelstrangbrüche freigesetzt, die eine SOS-Antwort der Zelle induzieren, welche auf Dauer eine letale Wirkung auf die Bakterienzelle hat^{2, 28}. Die bakterizide Wirkung variiert in Abhängigkeit vom jeweiligen Zeitpunkt innerhalb des Zellzyklus und korreliert möglicherweise mit dem Ausmaß der aktiven DNA-Synthese⁴⁶.

1.2.4 RESISTENZ GEGENÜBER CHINOLONEN

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Mechanismen der Resistenz gegenüber einem Chemotherapeutikum⁴³:

1. Veränderung der Zielstruktur
2. Inaktivierung des Chemotherapeutikums
3. Verminderte Konzentration in der Bakterienzelle

Von diesen sind bei verschiedenen grampositiven Kokken im Fall der Chinolone bis jetzt der erste^{24, 30, 31, 32, 59} und der dritte Mechanismus⁷³ nachgewiesen worden.

1.2.4.1 DIE VERÄNDERUNG DER ZIELSTRUKTUR

Die Veränderung der Zielstruktur beruht auf Punktmutationen in bestimmten Bereichen der Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*, die determinierend für die Chinolonresistenz sind, den so genannten „quinolone resistance-determining regions (QRDRs).“ Sie befinden sich in der Nähe des aktiven Zentrums, welches im Fall von *gyrA* um die Position Tyr122 lokalisiert ist⁴⁷. Aminosäurepositionen, an denen es besonders häufig zu Austausch kommt, werden als „hot spots“ bezeichnet. Im Falle von *S. pneumoniae* betrifft dies vor allem den Austausch an Position 81 (Ser→Phe, Tyr) in *gyrA*, an den Positionen 79 (Ser→Phe, Tyr) und 83 (Asp→Asn, Gly) in *parC* und 435 (Asp→Asn) in *parE*^{34, 45, 50, 54, 56, 68, 77, 96}. Der Einbau falscher Aminosäuren bedingt eine veränderte Struktur des Enzym-DNS-Komplexes, zu welchem die Chinolone eine verminderte Affinität aufweisen^{28, 45, 99}.

Bei den Viridans-Streptokokken wurden ebenfalls Mutationen in *gyrA* (Ser81Phe, Tyr) und *parC* (Ser79Phe, Tyr) nachgewiesen^{31, 37}. Ein *in vitro*-Austausch von genetischem Material, das die Fluorchinolone-resistenz determiniert, zwischen Viridans-Streptokokken und Pneumokokken ist beschrieben worden, weshalb *S. mitis* und *S. sanguis* in die vorliegende Untersuchung einbezogen wurden⁴⁹. Die Bedeutung dieses Austausches *in vivo* scheint jedoch begrenzt zu sein⁸.

In gramnegativen Bakterien wie *E. coli* ist die Gyrase das primäre Ziel der Chinolone, da Mutationen in *parC* nur in Anwesenheit von Alterationen im *gyrA*-Genbereich und bei hohem Resistenzniveau auftreten⁴⁵. Bei grampositiven Spezies wie *Staphylococcus aureus*^{87, 88} und *Streptococcus pneumoniae*^{39, 68, 74, 78, 81} ist es die Topoisomerase IV. Abhängig von der Struktur des Antibiotikums gibt es aber Ausnahmen, wie Sparfloxacin und Gatifloxacin, deren primäres Ziel bei Pneumokokken die Gyrase zu sein scheint^{34, 75}, sowie Clinafloxacin, bei welchem keine Targetpräferenz nachzuweisen ist⁷⁶.

1.2.4.2 VERMINDERTE KONZENTRATION IN DER BAKTERIENZELLE

Da die Fluorchinolone intrazelluläre Ziele angreifen, müssen sie in die Bakterienzelle gelangen, um ihre Wirkung entfalten zu können. Dies geschieht im Falle von *Streptococcus pneumoniae* durch passive Diffusion. In Anwesenheit von Glukose kann die Akkumulation der Chinolone in der Bakterienzelle gesenkt sowie durch Inhibitoren der Protonenpumpen und ATP-Synthese gesteigert werden¹⁰³. Bei gramnegativen Bakterien seit längerer Zeit bekannte Multidrug-Transporter, die eine Vielzahl von Stoffen aus der Zelle ausschleusen können, sind auch bei grampositiven Spezies gefunden worden. Bei *S. aureus* ist es das *norA*-Transmembranprotein, welches für die Resistenz verantwortlich ist^{57, 58, 69, 101}. Der Efflux von Chinolonen aus der Zelle kann durch das Pflanzenalkaloid Reserpin, welches in der Medizin auch als Antiarrhythmikum genutzt wird, gehemmt werden. Dadurch erhöht sich die Empfindlichkeit der Bakterien, welche diesen Effluxtransporter besitzen, gegenüber dem betroffenen Substrat¹⁰¹. Reserpin kann ebenfalls verhindern, dass sich überhaupt eine Resistenz ausbildet^{64, 65}. Durch Untersuchungen an Laborstämmen von *Streptococcus pneumoniae* wurden Vermutungen bestätigt, dass es ein solches Efflux-System auch bei dieser Spezies gibt⁷. Nachdem auch in klinischen Isolaten ein Effekt von Reserpin auf die minimalen Hemmkonzentrationen festgestellt und von Gill *et al.*³⁶ ein Protein mit 24% Sequenzübereinstimmung mit *norA* und *Bmr*

gefunden wurde, welches er *pmrA* (pneumococcal multidrug resistance proteine) nannte, wurde die große Bedeutung des Efflux bei der Resistenzentwicklung gegen Chinolone bei Pneumokokken erkannt¹².

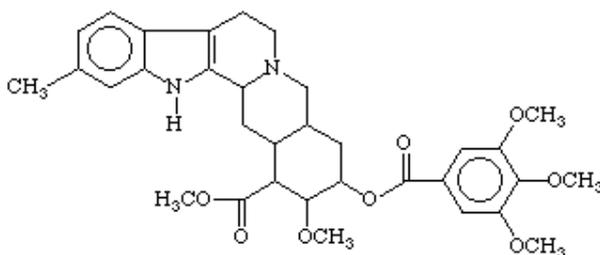


Abbildung 11: Strukturformel von Reserpin

1.3 EPIDEMIOLOGIE DER ANTIBIOTIKARESISTENZ

Die ersten Penicillin-resistenten Pneumokokken wurden 1965 in Boston gefunden. Bis in die späten siebziger Jahre hatten sie sich weltweit verteilt, und einige Jahre später waren in verschiedenen Regionen, darunter Spanien, Osteuropa, Südafrika und den USA, mehr als 10% der Pneumokokken resistent gegen Penicillin³³. Heute sind weltweit zwischen 6% und 80% der Pneumokokken gegen Penicillin und 0% bis 90% gegen Makrolide resistent¹⁰. Je höher die minimale Hemmkonzentration von Penicillin bei Pneumokokken ist, desto wahrscheinlicher sind die Bakterien auch resistent gegen andere Antibiotika wie Tetrazyklin, Chloramphenikol oder Cotrimoxazol. Erschwert wird die Situation durch die Tendenz der resistenten Stämme zur Ausbreitung zwischen einzelnen Ländern und sogar Kontinenten^{3, 98}. Bei nosokomialen Infektionserregern wie *S. aureus* ist der Anstieg der Resistenzen in den meisten Fällen ausgeprägter als bei Bakterien wie *S. pneumoniae*, die bei ambulant erworbenen Krankheiten eine große Rolle spielen^{1, 83}. Doch der anfängliche Erfolg der Fluorchinolone gegen Pneumokokken wird durch das Auftreten von Resistenzen gegen diese Antibiotikaklasse in Frage gestellt¹⁶. Resistente Bakterien, die durch ältere Chinolone selektiert wurden, zeigen Kreuzresistenz auch bei der Testung mit neueren Agenzien dieser Klasse⁹⁵.

Bei den Viridans-Streptokokken wird ebenfalls eine abnehmende Empfindlichkeit festgestellt. Untersuchungen Mitte der neunziger Jahre, unter anderem aus den USA, der Schweiz und Südafrika, haben Penicillinempfindlichkeit von teilweise unter 50% ergeben. Wie bei den Pneumokokken kommen auch bei den Viridans-Streptokokken Koresistenzen gegenüber anderen Antibiotika wie z. B. Tetrazyklin, Erythromycin und Gentamicin vor¹⁸.

Bei den A-Streptokokken ist das derzeit größte Problem die Resistenz gegen Makrolide. Bei durchschnittlich 5-15% der Isolate weisen Erythromycin, Azithromycin und Clarithromycin keine ausreichende Wirksamkeit auf^{15, 17, 40}. Penicillin und Fluorchinolone sowie Cephalosporine zeigen dagegen in den meisten Untersuchungen eine hervorragende *in vitro*-Aktivität^{4, 6}. Allerdings gibt es erste Berichte über eine Chinolonresistenz bei *Streptococcus pyogenes* aus den USA und Berlin (2,8% Ciprofloxacin-resistent)^{4, 100}. Bei verbreiteter Anwendung ist mit einer Zunahme der unempfindlichen Isolate zu rechnen.

1.4 FRAGESTELLUNG DER PROMOTIONSSCHRIFT

Die vorliegende Untersuchung wurde vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenz von *Streptococcus pneumoniae* und anderer wichtiger grampositiver Kokken gegenüber Fluorchinolonen durchgeführt. Dabei ist es von großer Bedeutung, fortlaufend epidemiologische Daten zum Vorkommen und zur Häufigkeit resistenter Isolate sowie den zu Grunde liegenden Mechanismen zu erheben, um die von diesen ausgehende Gefahr richtig einschätzen und Strategien zu deren Vermeidung entwickeln zu können.

427 *S. pneumoniae*-Isolate sowie 54 Stämme von *S. mitis* und 31 von *S. sanguis*, die man von 1997 bis 1999 in 20 Universitätskliniken in 12 europäischen Ländern isolierte, wurden untersucht. Dabei war die Empfindlichkeit dieser Bakterien gegenüber Ciprofloxacin und Levofloxacin als älteren Referenzsubstanzen und den neuen Vertretern Moxifloxacin, Gatifloxacin, Clinafloxacin und Gemifloxacin von Interesse. Der Anteil der als resistent gegenüber Ciprofloxacin einzustufenden Isolate sollte bestimmt und die *in vitro*-Aktivität der neuen Fluorchinolone gegenüber diesen ermittelt werden. Die verantwortlichen Mutationen in den für DNS-Gyrase und Topoisomerase IV kodierenden Genen sollten detektiert und der Einfluss von Effluxmechanismen untersucht werden.

Verschiedene Antibiotikaklassen und ältere Fluorchinolone können *in vitro* resistente Bakterien selektieren, und auch unter der Therapie kommt es zur Ausbildung von Resistenzen. Daher gingen wir in einem zweiten Schritt der Frage nach, wie groß das Potential der neueren Fluorchinolone ist, die Entwicklung von Resistenzen zu bewirken. Der Grundgedanke hinter dieser Untersuchung ist, durch den Einsatz von Präparaten mit einer deutlich geringeren Tendenz zur Selektion von resistenten Stämmen die Wirksamkeit der Fluorchinolone im Ganzen zu bewahren. Dabei könnten Unterschiede in der Targetpräferenz oder in der Anfälligkeit für den Efflux eine Rolle spielen. Substanzen, die sowohl Gyrase als auch Topoisomerase IV als gleichberechtigte Zielstrukturen angreifen (wie es von Clinafloxacin bekannt und von Gemifloxacin sowie den 8-Methoxychinolonen angenommen wird), müssen in beiden Enzymen Mutationen erwerben, um klinisch bedeutsame Resistenz aufzuweisen. Die geringe Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses könnte sich in einer langsameren Resistenzentwicklung niederschlagen.

Jeweils sechs Stämme von *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen subinhibitorischen Konzentrationen von sechs Fluorchinolonen ausgesetzt, die Resistenzentwicklung beobachtet und die Resistenzmuster und Effluxeigenschaften der Bakterien mit den höchsten MHK-Werten ermittelt.

Drittens sollte der Frage nachgegangen werden, in wie weit die neueren Chinolone in genetisch charakterisierten Pneumokokken mit einer reduzierten Ciprofloxacinempfindlichkeit das Resistenzniveau erhöhen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 BAKTERIEN

Die klinischen Isolate stammten aus der SENTRY-Studie, die ein langfristig angelegtes Überwachungsprogramm der häufigsten Krankheitserreger sowie der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber 26 Antibiotika ist ⁸⁶. Jeweils ein Isolat pro Patient, das hinsichtlich der vorgegebenen Kriterien als klinisch resistent einzustufen war, wurde analysiert. Das Referenzzentrum der Studie ist in Utrecht/Niederlande. Die Isolate stammen aus folgenden Universitätskliniken:

Krankenhaus der Elisabethinen, Linz (Österreich)
Hôpital Erasme, Brüssel (Belgien)
Hôpital St. Joseph, Paris (Frankreich)
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris (Frankreich)
Hôpital Edouard Herriot, Lyon (Frankreich)
A. Calmette Hôpital, Lille (Frankreich)
Universitätskliniken Freiburg (Deutschland)
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland)
National University of Athens, Athen (Griechenland)
University Hospital of Genoa, Genua (Italien)
University Hospital of Rome, Rom (Italien)
University Hospital Utrecht, Utrecht (Niederlande)
Jagiellonian University Hospital, Krakau (Polen)
University Hospital Warsaw, Warschau (Polen)
University Hospital of Coimbra, Coimbra (Portugal)
University Hospital of Sevilla, Sevilla (Spanien)
Hospital Ramon y Cajal, Madrid (Spanien)
Hospital de Bellvitge, Barcelona (Spanien)
CHUV, Lausanne (Schweiz)
St. Thomas's Hospital Medical School, London (Großbritannien)

Des Weiteren wurde der Laborstamm ATCC 49616 (*S. pneumoniae*) verwendet.

2.1.2 CHEMIKALIEN

1 kb-Marker, GibcoBRL (Eggerstein)

Agar, Fluka (Deisenhofen)
Agarose Ultra Pure, GibcoBRL (Eggerstein)
Blut, Charles River Wiga (Sulzfeld)
Kaninchenvollblut mit EDTA
Schafsvollblut mit EDTA
EDTA, Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure, Merck
Ethanol p.a., Riedel-de-Häen (Seelze)
Ethidiumbromid, BioRad (München)
Mineralöl, Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat, Merck
PCR-Nucleotid-Mix, Boehringer (Mannheim), Perkin Elmer (Weiterstadt)
Reserpin, Sigma (Deisenhofen)
Optochin, Sigma (Deisenhofen)

2.1.3 ENZYME

DNS-Polymerasen

AmpliTaq-Polymerase, Perkin Elmer (Weiterstadt)
Expand-High-Fidelity-Polymerase, Boehringer (Mannheim)

2.1.4 ANTIBIOTIKA

Ciprofloxacin, Bayer (Wuppertal)
Clinafloxacin, Parke-Davies (Ann Arbor)
Gatifloxacin, Grünenthal (Aachen)
Gemifloxacin, SmithKline Beecham (Brentford)
Levofloxacin, Hoechst (Frankfurt)
Moxifloxacin, Bayer (Wuppertal)
Sparfloxacin, Rhône-Poulenc Rorer (Köln)

2.1.5 FERTIGKITS

ABI Prism™ Ready-Reaction-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing Kit, Perkin Elmer (Weiterstadt)
ABI Prism™ Ready-Reaction-dRhodamine-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit, Perkin Elmer (Weiterstadt)
Microbank™, PRO-LAB Diagnostics (Ontario)
QIAquick-PCR-Purification-Kit, Qiagen (Hilden)

APIStrep, BioMérieux (Nürtlingen)

2.1.6 LABORGERÄTE

Autoklav, Westima-Sauter

Analysenwaage (Genauigkeit 0,01 mg), Sartorius (Göttingen)

Elektrophoresekammern und Zubehör, BioRad (München)

Mikrotiter-Photometer, Microscan

Sequenziergerät ABI Prism™ 377 DNS-Sequencer, Perkin Elmer (Weiterstadt)

Spannungsgerät, BioRad (München)

Spektralphotometer, Dr. Lange (Düsseldorf)

Sterilbank, Bio Gardhood

Thermocycler Perkin Elmer Cetus 480, Perkin Elmer (Weiterstadt)

Tischzentrifugen, Heraeus (Hanau)

Thermoschüttler, Eppendorf (Hamburg)

Vortexer, Witeg elektrik (Wertheim)

2.1.7 PUFFERLÖSUNGEN

10 x TBE

100mM Tris/HCl, pH 8,3; 100mM Borsäure; 25 mM EDTA

10 x Probenpuffer, 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M EDTA, pH 7,8; 50% (w/v) Glycerin

2.1.8 PLASTIKEINWEGARTIKEL

Alle Einwegartikel, Reaktionsgefäße und Mikrotiterplatten wurden von den Firmen Biozym (Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürtingen) und Perkin Elmer (Weiterstadt) bezogen.

2.1.9 NÄHRMEDIEN

Mueller-Hinton-Agar

Auf den bluthaltigen Agarplatten wurden die Streptokokken herangezogen.

Zusammensetzung:

2,0 g/l Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g

17,5 g/l Caseinhydrolysat
1,5 g/l Stärke
17,0 g/l Agar
mit Blutzusatz: 100 ml Schafsblut
pH-Wert: 7,4

Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

Dieses Nährmedium wurde für Flüssigkulturen und MHK-Bestimmungen der verschiedenen Streptokokken-Spezies verwendet. Für die MHK-Bestimmung wurde die Bouillon in doppelter Konzentration angesetzt.

Zusammensetzung:

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

Durch Autoklavieren wurden die Kulturmedien bei 1,2 bar und 120°C für 20 min sterilisiert. Nach Abkühlen auf 50°C wurde der Mueller-Hinton-Agar in sterile Petrischalen gegossen. Agarplatten und Bouillon konnten bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert werden.

2.2 METHODEN

2.2.1 BAKTERIENIDENTIFIZIERUNG

Die Bakterien wurden nach den üblichen phänotypischen Merkmalen identifiziert. Die Pneumokokken wurden von den übrigen Streptokokken aufgrund ihrer Optochinempfindlichkeit abgegrenzt. Streptococcus mitis und Streptococcus sanguis wurden durch ihre biochemischen Reaktionen in der „bunten Reihe (APIStrep®)“ näher charakterisiert.

2.2.2 ANZUCHT DER BAKTERIEN

Eine von der Stammplatte genommene Einzelkolonie oder ein Kügelchen aus der Microbank™ (s. u.) wurden auf das jeweilige Nährmedium überimpft und bei 37°C und 5% CO₂ ca. 20 Stunden kultiviert. Auf Blutagarplatten gezüchtete Bakterien konnten bei 4°C bis zu drei Wochen gelagert werden.

2.2.3 AUFBEWAHRUNG DER BAKTERIEN

Zur langfristigen Aufbewahrung der Bakterienisolate wurde eine Microbank™ (PRO-LAB Diagnostics) nach Angaben des Herstellers angelegt. Die in den sterilen Kryogefäßen enthaltenen Keramikkügelchen haben infolge von Säurebehandlung eine poröse Oberfläche, an welche die Mikroorganismen vollständig binden. Nach Beimpfen wurde die Microbank bei -70°C aufbewahrt.

2.2.4 MINIMALE HEMMKONZENTRATION (MHK)

Der Maßstab für die *in vitro*-Aktivität eines Antibiotikums ist die minimale Hemmkonzentration (MHK). Damit wird die geringste Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) eines Antibiotikums bezeichnet, welche in der Lage ist, die sichtbare Vermehrung von Bakterien zu verhindern.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurde entsprechend der Richtlinien der National Committee for Clinical Laboratory Standards durchgeführt^{71, 72}. Zunächst wurde von einer frisch bewachsenen Agarplatte die benötigte Bakterienkultur entnommen und in Mueller-Hinton-Bouillon überführt. Diese Probe wurde ca. 18 – 20 Stunden bei 37°C unter einer CO_2 -Spannung von 5% inkubiert. Daraufhin wurde die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt und auf 0,1 eingestellt.

Zur Herstellung der Antibiotikaverdünnungsreihen ging man von der vierfachen Konzentration der höchsten zu testenden Antibiotikamenge aus, da im weiteren Verlauf noch zweimal 1:2 verdünnt wurde.

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (8 x 12 Löcher) mit geradem Boden wurde mit 100 μl Trypton-Soja-Bouillon je Loch befüllt. Anschließend pipettierte man in die obere Reihe 100 μl der Antibiotikallösung und mischte durch mehrmaliges Aufziehen und Entleeren der Pipette. 100 μl dieser Lösung wurden in die darunter liegende Reihe überführt. Dieser Prozess wurde bis zur vorletzten Reihe fortgesetzt. Somit wurde von einer Reihe zur nächstfolgenden eine 1:2 Verdünnung des Antibiotikums erreicht. Die Reihe ohne Antibiotikazusatz diente der Kontrolle des Bakterienwachstums.

Abschließend wurden die Platten mit den Bakterienstämmen beimpft, wobei für jeden Stamm eine Doppelbestimmung durchgeführt sowie auf jede Platte ein Referenz-

stamm mit bekannter MHK überimpft wurde, um die Validität des Testes zu gewährleisten.

Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ ca. 24 Stunden bebrütet und anschließend mit Hilfe eines Photometers für Mikrotiterplatten ausgewertet. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt.

2.2.5 RESERPIN-TEST

Reserpin ist ein Alkaloid-Derivat und hemmt bestimmte Effluxsysteme, durch welche Bakterien Antibiotika aus der Zelle ausschleusen können, so dass diese nicht mehr an ihrer Zielstruktur innerhalb der Zelle wirksam werden können. Mit Hilfe des folgenden Testes wurde der Einfluss dieser Effluxsysteme auf die minimale Hemmkonzentration untersucht. Die Versuchsdurchführung entsprach der oben beschriebenen MHK-Testung, wobei jeweils einer Doppelprobe Reserpin zugesetzt wurde, während eine weitere Doppelprobe desselben Stamms ohne das Alkaloid angesetzt wurde. Die Konzentration des Reserpin, dem zur besseren Löslichkeit Eisessig zugegeben wurde, betrug im Versuchsansatz 20µg/ml. Ein möglicher eigenständiger Einfluss von Reserpin und Eisessig auf das Bakterienwachstum wurde von vornherein ausgeschlossen. Alle Bakterienisolate wurden in Doppelbestimmung getestet und jede Testung drei Mal wiederholt. Auf jeder Platte wurde ein Kontrollstamm mit bekannter MHK mitgeführt sowie das Wachstum jeder Bakterienprobe ohne Antibiotikum und Reserpin kontrolliert. Wenn Effluxsysteme zur Chinolonresistenz beitragen, resultierte eine Verminderung des MHK-Wertes in Anwesenheit von Reserpin. Diese wurde in Verdünnungsstufen angegeben.

2.2.6 MUTANTENSELEKTION

Die Entwicklung von Mutationen wurde in Anwesenheit von steigenden Antibiotikakonzentrationen untersucht. Von entscheidender Bedeutung waren dabei die subinhibitorischen Konzentrationen, die hoch genug sind, um mutierten Bakterien einen Selektionsvorteil gegenüber den Wildtypen zu gestatten, jedoch nicht am Wachstum hindern. Der Versuch dauerte insgesamt elf Tage.

Nach Bestimmung der MHK-Werte wurden Übernachtskulturen der zu testenden Stämme in Trypton-Soja-Bouillon angelegt. Am ersten Tag wurde ausgehend von der minimalen Hemmkonzentration in sieben Reagenzgläsern mit 9,9 ml TSB eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nach Beimpfen des Mediums mit 0,1 ml Bakterien-Suspension (ca. 5×10^7 KBE) der Übernachtskultur entsprach die Konzentration des jeweiligen Antibiotikums in dem Gesamtansatz von 10 ml im mittleren Reagenzglas

(Röhrchen 4) dem MHK-Wert, sowie jeweils eine, zwei und drei Verdünnungsstufen unterhalb (Röhrchen 3, 2 und 1) und oberhalb (Röhrchen 5, 6 und 7) dieses Wertes. Die Antibiotikakonzentrationen in den einzelnen Röhrchen waren also:

1. Röhrchen: 0,125 x MHK
2. Röhrchen: 0,25 x MHK
3. Röhrchen: 0,5 x MHK
4. Röhrchen: 1 x MHK
5. Röhrchen: 2 x MHK
6. Röhrchen: 4 x MHK
7. Röhrchen: 8 x MHK

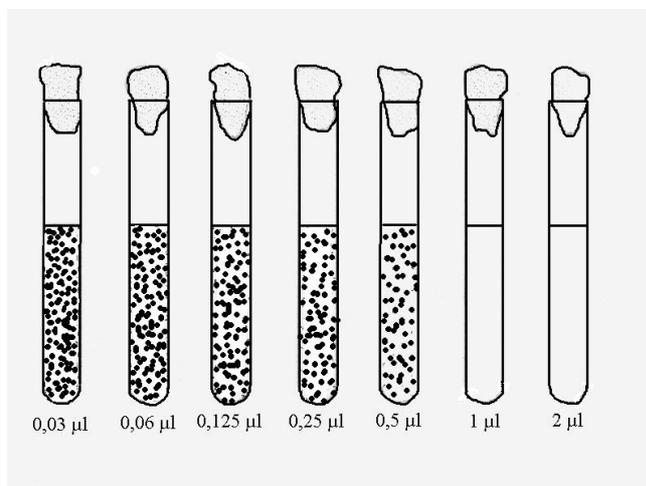


Abbildung 12: Mutantenselektion.

Streptococcus pneumoniae Stamm 6 am Tag 1 in Ciprofloxacinhaltigem Medium. Die MHK des Ausgangsstammes ist 0,25 µg/ml. Nach ca. 20 Stunden Bebrütung zeigte sich im 4. Reagenzglas mit 0,5 µg/ml Ciprofloxacin noch sichtbares Wachstum ($OD \geq 0,5$). Eine neue Verdünnungsreihe mit dieser Konzentration als mittlerem Wert wurde hergestellt und mit der Bakteriensuspension aus dem vierten Röhrchen nach einer Verdünnung von 1:100 beimpft. In den nächsten Tagen wurde der Vorgang entsprechend wiederholt.

Die Kulturen wurden ca. 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Am nächsten Tag (Tag 1) wurde das Bakterienwachstum durch Messung der Trübung im Photometer bei einer Wellenlänge von 623 nm bestimmt. Die Bakteriensuspension, welche noch sichtbares Wachstum aufwies (optische Dichte $\geq 0,5$), wurde zur Fortführung des Versuches herangezogen. Ausgehend von der Antibiotikakonzentration dieser Suspension als mittlerem Wert wurde eine neue Verdünnungsreihe hergestellt und mit den Bakterien nach einer Verdünnung von 1:100 beimpft. Diese Prozedur wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Am Tag 10 wurde die Bakteriensuspension mit der höchsten MHK herausgesucht und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Jeweils vier Einzelkolonien wurden dann auf Mikrobank überführt, um sie für weitere Untersuchungen zu lagern. Die Mutanten wurden ebenfalls zehn Tage lang auf chinolonfreiem Agar subkultiviert und dann erneut auf ihre Resistenz getestet.

2.2.7 NUKLEINSÄUREN (PRIMER)

Die für die Polymerase-Kettenreaktion und die Sequenzierreaktion verwendeten Oligonukleotide (Primer) stammten von der Firma INTERACTIVA Biotechnologie (Ulm).

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden verwendet:

Im *gyrA*-Bereich ³⁷:

gyrA 44 (5'-Primer): 5' – CCG TCG CAT TCT CTA CGG AAT GAA TGA ATT – 3'

gyrA 170 (3'-Primer): 5' – AGT TGC TCC ATT AAC CAA AAG GTT TGG AAA – 3'

Im *gyrB*-Bereich ⁶⁸:

gyrB 376 (5'-Primer): 5' – AGA TTG CCA AAC GTA TCG TAG A – 3'

gyrB 512 (3'-Primer): 5' - TGG GCT CCA TCG ACA TCG GC – 3'

Im *parC*-Bereich ⁶⁸:

parC 152 (5'-Primer): 5' – AAG GAT AGC AAT ACT TTT GAC – 3'

parC 50 (3'-Primer): 5' – GTT GGT TCT TTC TCC GTA TCG – 3'

Im *parE*-Bereich ³⁷:

parE 398 (5'-Primer): 5' – AAG GCG CGT GAT GAG AGC – 3'

parE 483 (3'-Primer): 5' – TCT GCT CCA ACA CCC GCA – 3'

2.2.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) kann ein bestimmtes Gen *in vitro* enzymatisch vervielfältigt werden. Voraussetzung ist, dass die Basensequenzen bekannt sind, welche das gewünschte Gen einrahmen. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche diesen Basensequenzen komplementäre Strukturen aufweisen, dienen als Startermoleküle (engl. primer). Die Primer werden so ausgewählt, dass sie antiparallel zueinander an beide DNS-Stränge hybridisieren, so dass nur der gewünschte DNS-Abschnitt amplifiziert wird. Die Primer werden dem Reaktionsansatz zusammen mit einer hitzestabilen DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) und Nucleosidtriphosphaten im Überschuss hinzu gegeben.

Die PCR läuft in drei Schritten ab:

1. Denaturierung: In diesem Schritt werden die DNS-Doppelhelices unter Hitze- einwirkung (94°C) in Einzelstränge aufgespaltet.
2. Amplifikationszyklus: Der folgende Amplifikationszyklus besteht seinerseits aus drei Schritten und wird mehrmals wiederholt. Einer Denaturierungsphase folgt das so genannte Annealing. Dabei lagern sich die Primer an die kom- plementären DNS-Fragmente, welche das zu vervielfältigende Gen ein- rahmen. In der Extensionsphase wird die DNS von der Polymerase entlang der Einzelstränge synthetisiert. Dabei haben die neu gebildeten DNS-Stränge noch keine definierte Länge, da die Synthese so lange fortgesetzt wird, bis die Taq-Polymerase entweder von alleine anhält oder von einem neuen Zyklus unterbrochen wird. Ab dem dritten Zyklus entstehen nur noch Pro- dukte der gesuchten Länge, die durch die Position der Primer in der Original- matrix vorgegeben sind. Da mit jedem Mal eine doppelte Anzahl von Genen als Matrize zur Neusynthese zur Verfügung steht, nimmt die Menge an DNS exponentiell zu. Nach 29 Zyklen kann also bei 100%iger Ausbeute eine Ver- mehrung auf 2^{29} Kopien erwartet werden. Die Vervielfältigung bricht erst bei Mangel an Primern und Nukleosidtriphosphaten sowie bei weitestgehender Besetzung der Polymerasen ab.
3. Rest-Extension: Dieser Schritt wird zur Sicherheit an den Amplifikations- zyklus angeschlossen, um alle eventuell noch unvollständig synthetisierten Stränge fertig zu stellen.

Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR ein Reaktionsansatz ohne DNS bzw. Bak- terienkolonie mitgeführt.

2.2.8.1 Material

PCR-Ansatz (s. u.)
Aqua dest. (steril)
Mineralöl
0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße
Thermocycler

2.2.8.2 Durchführung

PCR-Ansatz

Templat: 1 Bakterienkolonie bzw. 1 µl Zellysat

Primer 1: 2 μ l
 Primer 2: 2 μ l
 dNTP-Mix: 2 μ l
 10 x PCR-Puffer: 5 μ l
 MgCl₂: 5 μ l
 DNS-Polymerasen
 Taq-Polymerase: 0,6 μ l
 Steriles destilliertes H₂O: 33,4 μ l bzw. 32,4 μ l

Die Polymerase-Kettenreaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

PCR-Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zahl der Zyklen
Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	55	30
Annealing	55	65	
Extension	72	70	
Rest-Extension	72	600	1

Anschließend wurden die PCR-Produkte bei 4°C gekühlt.

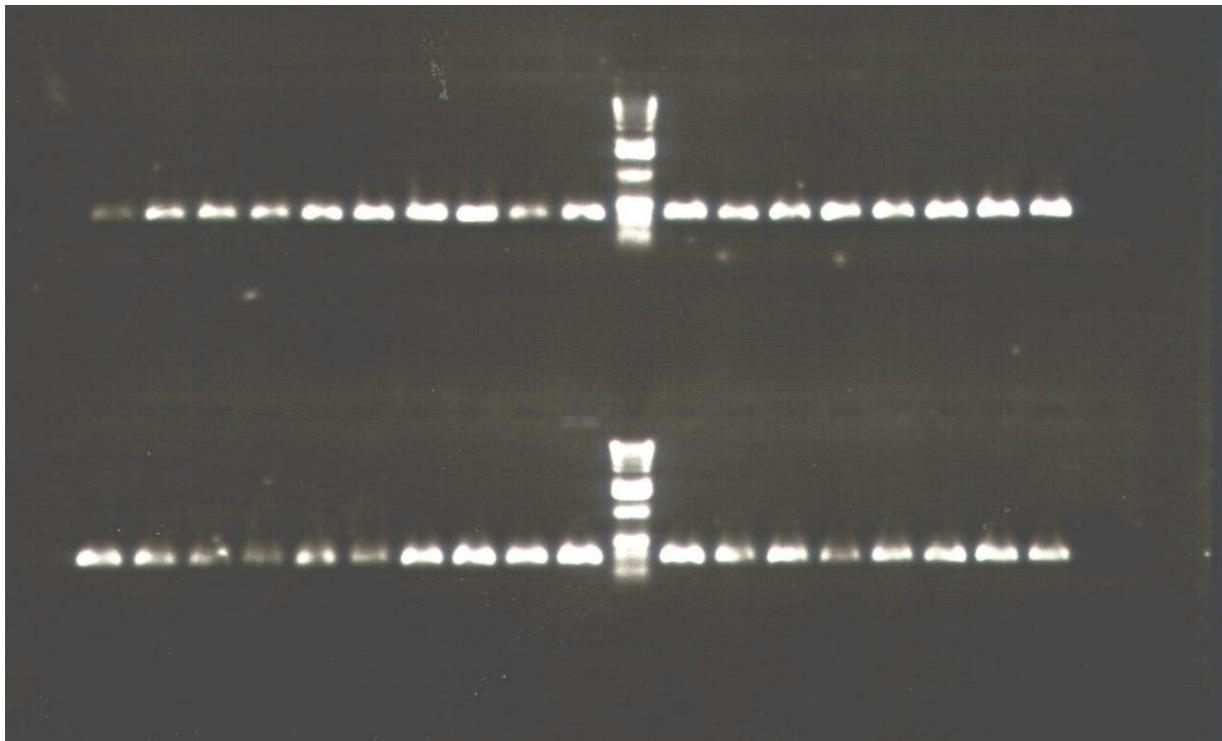


Abbildung 13: Gelelektrophorese der PCR-Produkte des *gyrA*-Genabschnitts (obere Reihe) und des *parC*-Genabschnitts (untere Reihe) von *Streptococcus pneumoniae*

2.2.9 GELELEKTROPHORESE

In einem Gel werden die DNS-Fragmente durch Anlegen einer Spannung nach Größe und Ladung getrennt. Das Gel enthält Ethidiumbromid, welches in die DNS-Moleküle interkaliert. Unter UV-Licht können die in der PCR gewonnenen Gene als Banden im Gel sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.9.1 Material

TBE-Puffer

Agarosegel

1 kB-Marker

Bluemarker

Sartorius-Analysenwaage

Gelgießvorrichtung samt Kämmen (20 Slots)

Gelelektrophorese-Apparatur

Mikrowelle

1,5 ml-Reaktionsgefäße

Fotoapparatur mit UV-Licht-Transluminator

2.2.9.2 Durchführung

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurden 11 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in die Vorrichtung gegossen. Nach 30 min war das Gel fest und konnte in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Kammer des Elektrophoreseapparates gegeben werden.

In die Reaktionsgefäße wurden 8 µl des PCR-Reaktionsgemisches bzw. 4µl der aufgereinigten PCR-Produkte zusammen mit 4 µl Bluemarker pipettiert und durch kurzzeitiges Zentrifugieren vermischt. Der Bluemarker diente dazu, den Verlauf der Elektrophorese sichtbar zu machen. Die Proben wurden nun in die Slots des Gels gefüllt, wobei ein Slot in der Mitte des Gels dem 1-kB-Marker (5 µl) vorbehalten blieb. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes wurden dem Elektrophorese-Ansatz neben dem 1 kB-Marker, der in 5 µl 50 ng Produkt enthielt, zwei Verdünnungen mit 25 ng bzw. 15 ng hinzugefügt. Durch Vergleich der Stärke der Signale, die von den DNS-Banden der PCR-Produkte bzw. von den Markern ausgingen, konnte die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte abgeschätzt werden.

Bei einer Spannung von 80 V ließ man die Elektrophorese unter Kontrolle des Bluemarkers so lange laufen, bis eine ausreichende Trennung der kB-Marker erwartet

werden konnte. Das Gel wurde nach Entnahme aus der TBE-Pufferlösung unter UV-Licht fotografiert.

2.2.10 AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE

In dem Reaktionsgemisch, das der PCR entnommen wurde, befanden sich neben PCR-Produkten Primer, Nukleosidtriphosphate, Polymerasen, Salze und Mineralöl. Um die DNS von diesen Stoffen zu befreien, wurde eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt.

Dabei wurden PCR-Produkte mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb in einem ersten Schritt bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silikonmembran gebunden, während alle Kontaminationen ausgewaschen wurden. In einem zweiten Schritt wurde die gereinigte DNS von der Membran gelöst und in Tris-Puffer eluiert.

2.2.10.1 Material

QIAquick PCR Purification Kit (Puffer PB, Waschpuffer PE, Reinigungssäulen, 2 ml Sammelgefäße)

2.2.10.2 Durchführung

Dem PCR-Reaktionsgemisch wurden 300 µl Puffer PB hinzugefügt und beides gut vermischt. Anschließend überführte man alles in eine QIAquick-Säule, die in einem 2 ml Sammelgefäß stand. Die Probe wurde 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Im weiteren Verlauf wurde die Säule wieder in das Sammelgefäß gestellt, 750 µl Waschpuffer PE wurden hineinpipettiert und wiederum eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut verworfen und die Säule noch einmal für eine Minute in die Zentrifuge gegeben.

Die Säulen wurden nun in Eppendorf-Cups gestellt, 40 µl Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in die Mitte der Säule gegeben und für eine Minute stengelassen. Der Puffer band die PCR-Produkte, so dass diese von der Membran gelöst wurden. Nach nochmaligem 60sekundigem Zentrifugieren befand sich die Lösung mit der aufgereinigten DNS in den Eppendorf-Cups.

2.2.11 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Terminationsmethode. In einer der PCR analogen Reaktion wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte

Basen eingesetzt, deren statistischer Einbau zum Kettenabbruch führte. Im Unterschied zur PCR wurde nur eine Strangrichtung synthetisiert. Es entstanden dabei Fragmente mit einer Länge zwischen einer Base und dem vollständigen Genabschnitt (Sequenzierungsreaktion).

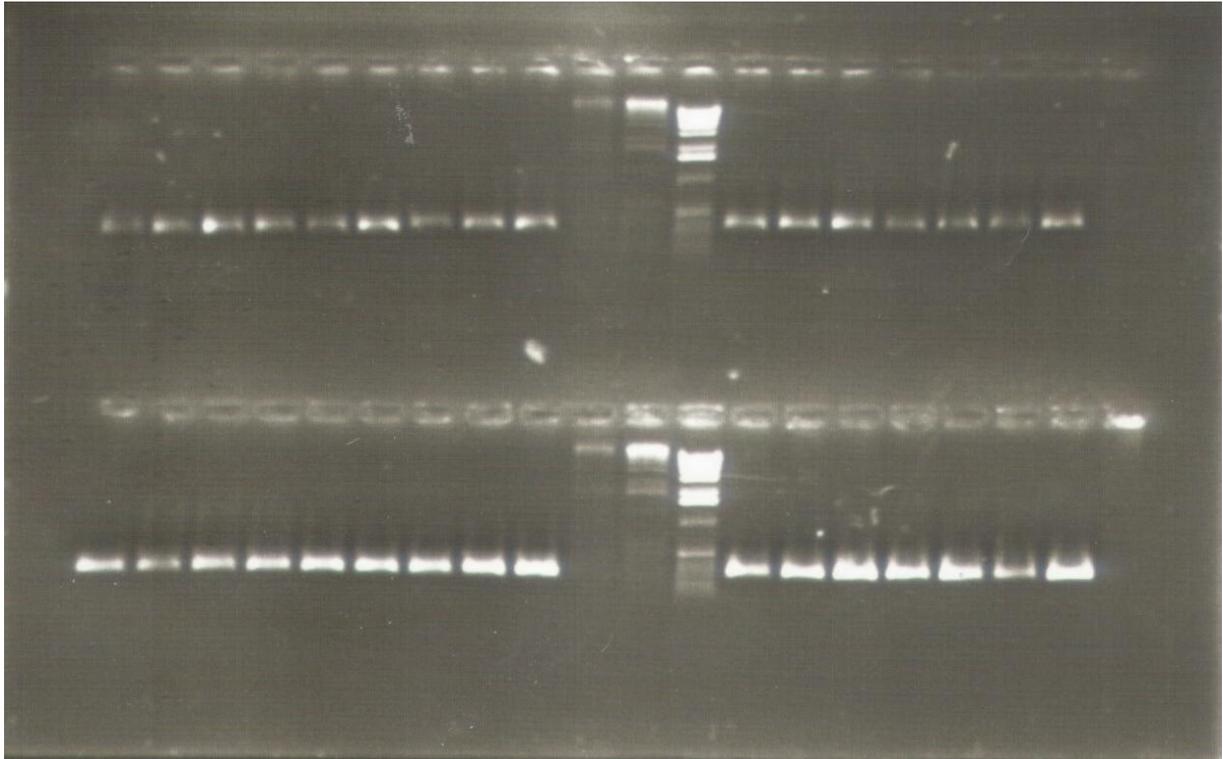


Abbildung 14: Gelelektrophorese der aufgereinigten *gyrA*-Genabschnitte (obere Reihe) und *parC*-Genabschnitte (untere Reihe) von *Streptococcus pneumoniae*.

Anschließend wurde die DNS aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt (Fällungsreaktion) und in einem Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da jeder Base ein bestimmter Rhodaminmarker zugeordnet war, konnte anhand dieses Signals die an der jeweiligen Position befindliche Base ermittelt werden (Sequenzanalyse).

2.2.11.1 SEQUENZIERUNGSREAKTION

2.2.11.1.1 Material

Reaktionsansatz (s. u.)

3 mol/l Natriumacetat, pH 5,2

Puffer

Ethanol, abs.

Aqua dest. (steril)

1,5 ml Reaktionsgefäße

Thermocycler

Vortexer

Mikrozentrifuge

Sequenziergerät

2.2.11.1.2 Durchführung

Bevor das Reaktionsgemisch für die Sequenzierungsreaktion angesetzt wurde, schätzte man die Konzentration des gereinigten PCR-Produktes in der Tris-HCl-Lösung durch eine Gelelektrophorese ab. Dabei wurde das unter UV-Licht generierte Signal der einzelnen Banden im Agarosegel mit einem definierten Längenstandard (kB-Marker) verglichen. In Abhängigkeit von der Konzentration des PCR-Produktes wurden zwischen 8 und 15 μ l des die DNS enthaltenden Puffers (entsprechend 30-60 ng DNS) eingesetzt. Im Idealfall sollte die Probe 50 ng DNS enthalten. Die nicht-radioaktive Markierung erfolgte mit dem ABI PrismTM Ready-Reaction-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit und dem Ready-Reaction-dRhodamine-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe der entsprechenden bei der PCR benutzten Primer durchgeführt, wobei nur der 5'-Primer zum Einsatz kam, da dieser die Polymerisierungsrichtung vorgab, bei welcher die Sequenz am Ende von links nach rechts abgelesen werden konnte. Eine Rest-Extension war im Gegensatz zur PCR nicht erforderlich.

Reaktionsansatz:

Gereinigtes PCR-Produkt: x μ l (30-60 ng)

5'-Primer: 1 μ l (0,1 μ mol)

Sequenzier-Mix

(Tris-Puffer, MgCl₂, Taq-Polymerase, farbig markiertes dNTP): 4 μ l

Steriles destilliertes H₂O: y μ l

Die Reaktion fand unter den folgenden Bedingungen statt:

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl
Denaturierung	96	300	1
Denaturierung	96	30	25
Annealing	50	15	
Extension	60	240	

2.2.11.2 FÄLLUNGSREAKTION

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde die DNS aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt. Das Gemisch wurde hierzu zunächst mit destilliertem H₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend in ein Eppendorff-Cup gegeben, in welchem sich 250 µl 96%iges, unvergälltes Ethanol und 10 µl 3mol Na-Acetat befanden. Nach dem Vermischen im Vortexer wurde 30 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig abpipettiert. Daraufhin wurden 300 µl 70%iges Ethanol in das Reaktionsgefäß gegeben und erneut nach dem Vermischen für 15 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abgenommen und das Safelock-Cup solange im Eppendorff-Thermomixer bei 37°C offen stehengelassen, bis das DNS-Pellet vollständig getrocknet war.

2.2.11.3 SEQUENZANALYSE

Die Sequenzanalyse wurde mit dem ABI Prism™ 377 DNS-Sequenzer durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Das DNS-Pellet wurde in 4 µl TSR-Puffer (Perkin Elmer) aufgenommen und für zwei Minuten bei 95°C denaturiert. Unter ständiger Kühlung wurde letztendlich eine Probe von 1 µl auf eine Spur des ABI-Sequenzer geladen. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 2,5 kV. Dabei wurden die verschieden langen DNS-Fragmente, deren jeweils endständige Base mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Die Konzentration der Farbmarker wurde mittels eines Computerprogramms (Sequence-Analysis 1.0.2 der Firma Perkin Elmer) in Kurven aufgezeichnet, wobei der jeweils höchste Peak die entsprechende Base an der jeweiligen Position anzeigte.

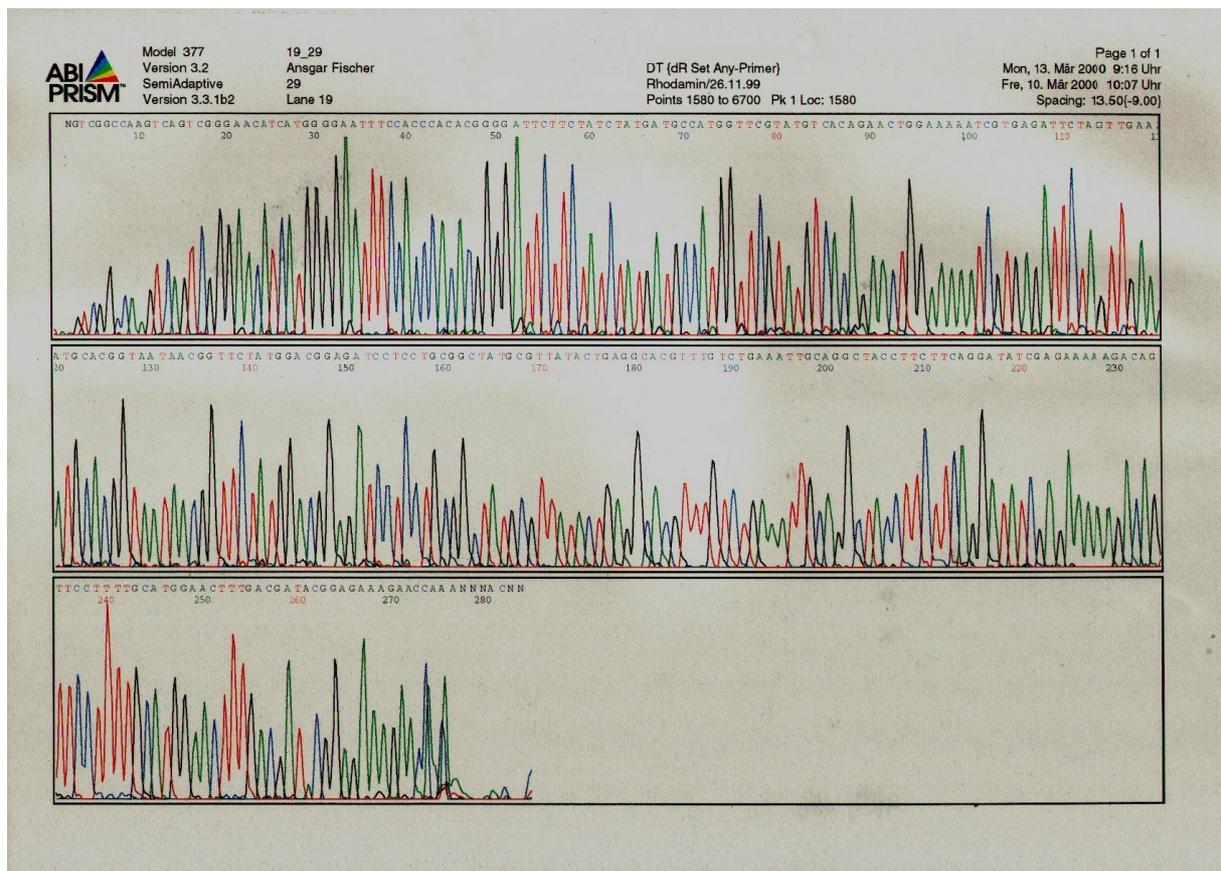


Abbildung 15: Ergebnis einer Sequenzanalyse am Beispiel des *parC*-Genfragments von *Streptococcus pneumoniae*

3. ERGEBNISSE

3.1 EPIDEMIOLOGISCHER ÜBERBLICK ÜBER DIE FLUORCHINOLON-RESISTENZ KLINISCHER ISOLATE UND DIE ZU GRUNDE LIEGENDEN MUTATIONSMUSTER

Es wurden 54 *Streptococcus mitis*, 31 *Streptococcus sanguis* und 427 *Streptococcus pneumoniae*-Isolate, die zwischen 1997 und 1999 in 20 Universitätskliniken gesammelt wurden, auf ihre minimale Hemmkonzentration untersucht. 11 *Streptococcus mitis* (20%), 5 *Streptococcus sanguis* (16%) und 25 *Streptococcus pneumoniae*-Isolate (6%) zeigten einen MHK-Wert $\geq 4\mu\text{g/ml}$ bei der Testung mit Ciprofloxacin und wurden in die Untersuchung eingeschlossen.

3.1.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Bei *Streptococcus pneumoniae* wurde der höchste MHK-Wert bei 3 Isolaten mit 32 $\mu\text{g/ml}$ gegen Ciprofloxacin gefunden. Reserpin vermochte bei 20 von 25 Isolaten die minimale Hemmkonzentration um 1 – 4 Verdünnungsstufen zu reduzieren. Ciprofloxacin zeigte von allen getesteten Antibiotika die geringste *in vitro*-Aktivität, während Gemifloxacin das Bakterienwachstum am besten hemmte. Bei keinem Isolat lag

Stamm	MHK-Werte							Mutationen in der QRDR von			
	Cipro	C + Res	Levo	Gati	Moxi	Clina	Gemi	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>
1	4	1	2	0.5	0.25	0.125	0.06	-	-	-	I460Val
2	4	4	1	0.5	0.125	0.125	0.125	-	-	-	I460Val
3	4	1	2	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	-	-
4	4	2	2	0.5	0.25	0.125	0.06	-	-	-	I460Val
5	4	4	1	1	0.25	0.06	0.06	-	-	-	-
6	4	2	4	2	1	0.25	0.125	S81F	S79F	-	I460Val
7	4	1	2	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	-	I460Val
8	4	2	2	0.25	0.25	0.125	0.125	-	-	-	I460Val
9	4	4	4	2	1	0.25	0.125	S81Y	S79F	-	I460Val
10	4	1	4	2	1	0.25	0.25	S81F	D83N	-	-
11	4	2	8	4	2	0.5	0.5	S81Y	D83N	-	I460Val
12	4	4	2	0.5	0.5	0.125	0.25	-	-	-	I460Val
13	4	4	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	-	-
14	8	1	8	4	2	0.5	0.25	S81F	S79F	-	I460Val
15	8	2	4	2	1	0.25	0.25	S 81F	S 79F	-	I460Val
16	16	4	8	4	2	0.5	0.5	S 81Y	D83N	-	I460Val
17	16	8	8	4	2	0.5	0.25	S 81F	S 79F	-	-
18	16	8	16	8	4	0.5	0.5	S 81Y	D83N	-	I460Val
19	16	4	16	8	4	1	0.5	S 81F	D83N	-	I460Val
20	16	2	16	4	2	0.5	0.25	S 81Y	S 79F	-	-
21	16	4	8	4	2	1	0.5	S 81F	S 79F	-	-
22	16	8	8	4	2	0.5	0.2	S 81F	S 79F	-	I460Val
23	32	16	8	4	2	0.5	0.5	S 81Y	S 79F	-	I460Val
24	32	8	8	2	2	0.5	0.25	S 81F	S 79F	-	I460Val
25	32	2	8	4	2	0.5	0.5	S 81Y	D83N	-	I460Val

Tabelle 2: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von *Streptococcus pneumoniae*

der MHK-Wert für Gemifloxacin über 0,5 µg/ml. Die übrigen Chinolone waren in der Reihenfolge zunehmender Wirksamkeit Levofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Clinafloxacin.

Vier von 13 *Streptococcus pneumoniae*-Isolaten mit einem MHK-Wert von 4 µg/ml und alle mit 8 µg/ml wiesen Aminosäureaustausche im von *parC* kodierten Bereich auf, und zwar Ser79→Phe oder Asp83→Asn. Dieselben Stämme hatten auch eine Punktmutation in *gyrA*, welche zu einem Austausch von Ser81 zu Phe oder Tyr führte. Keine Mutationen wurden in *gyrB* festgestellt, während 18 von 25 Isolaten den Aminosäureaustausch Ile460→Val im Bereich von *parE* zeigten.

3.1.2 VIRIDANS-STREPTOKOKKEN

Die Situation der Viridans-Streptokokken stellte sich wie folgt dar: Der höchste MHK-Wert bei *Streptococcus mitis* war 16 µg/ml, bei *Streptococcus sanguis* 8 µg/ml gegenüber Ciprofloxacin. Die Aktivitäten der anderen Chinolone entsprachen denen gegenüber Pneumokokken. Reserpin erniedrigte den MHK-Wert aller Viridans-Streptokokken um 1-4 Verdünnungsstufen.

Bei keinem *Streptococcus mitis* und *Streptococcus sanguis*-Isolat mit einer MHK von 4 µg/ml wurde in *gyrA* oder *parC* eine Mutation festgestellt. Bei den Stämmen mit einer minimalen Hemmkonzentration von 8 µg/ml zeigten drei von vier *Streptococcus mitis*- und ein *Streptococcus sanguis*-Isolat die Mutation Ser79→Ile, ein *Streptococcus mitis* Ser79→Phe. Bei diesen fünf Stämmen war auch eine Punktmutation in *gyrA* vorhanden, die zum Aminosäureaustausch Ser81→Phe oder Ser81→Tyr führte. Bei 8 von 16 Viridans-Streptokokken konnte der Aminosäureaustausch Ser494→Thr in *gyrB* festgestellt werden, jedoch keiner in *parE*.

Stamm	MHK-Werte							Mutationen in der QRDR von			
	Cipro	C + Res	Levo	Gati	Moxi	Clina	Gemi	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>
1	2	0.5	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
2	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
3	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
4	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
5	4	1	1	0.5	0.125	0.125	0.06	-	-	-	-
6	4	0.5	2	0.5	0.125	0.25	0.25	-	-	-	-
7	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
8	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.25	-	-	-	-
9	8	2	2	0.5	0.25	0.125	0.125	S81F	S79F	-	-
10	8	2	2	0.5	0.25	0.125	0.125	S81Y	S79I	S494T	-
11	16	1	4	1	0.25	0.5	0.5	S81F	S79I	S494T	-
12	16	4	4	2	0.5	0.125	0.125	S81Y	S79I	-	-

Tabelle 3: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von *Streptococcus mitis*

Stamm	MHK-Werte							Mutationen in der QRDR von			
	Cipro	C + Res	Levo	Gati	Moxi	Clina	Gemi	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>
1	4	0.5	1	0.5	0.125	0.125	0.25	-	-	-	-
2	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	S494T	-
3	4	1	1	0.5	0.25	0.125	0.06	-	-	S494T	-
4	4	1	2	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	-	-
5	8	1	2	0.5	0.25	0.125	0.125	S81F	S79I	-	-

Tabelle 4: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von *Streptococcus sanguis*

3.2 IN VITRO-RESISTENZENTWICKLUNG BEI FLUORCHINOLON-EMPFINDLICHEN STÄMMEN

3.2.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Im nächsten Schritt wurde die *in vitro* Resistenzentwicklung von sechs *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen in subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Sparfloxacin, Moxifloxacin, Clinafloxacin und Gemifloxacin untersucht. Die Subkultivierung in chinolonhaltigem Medium führte in allen Fällen zu erhöhten MHK-Werten. Den Verlauf der Resistenzentwicklung zeigen die Abbildungen 16 bis 21. Die minimalen Hemmkonzentrationen der Wildtyp-Stämme und der selektierten Mutanten sowie die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

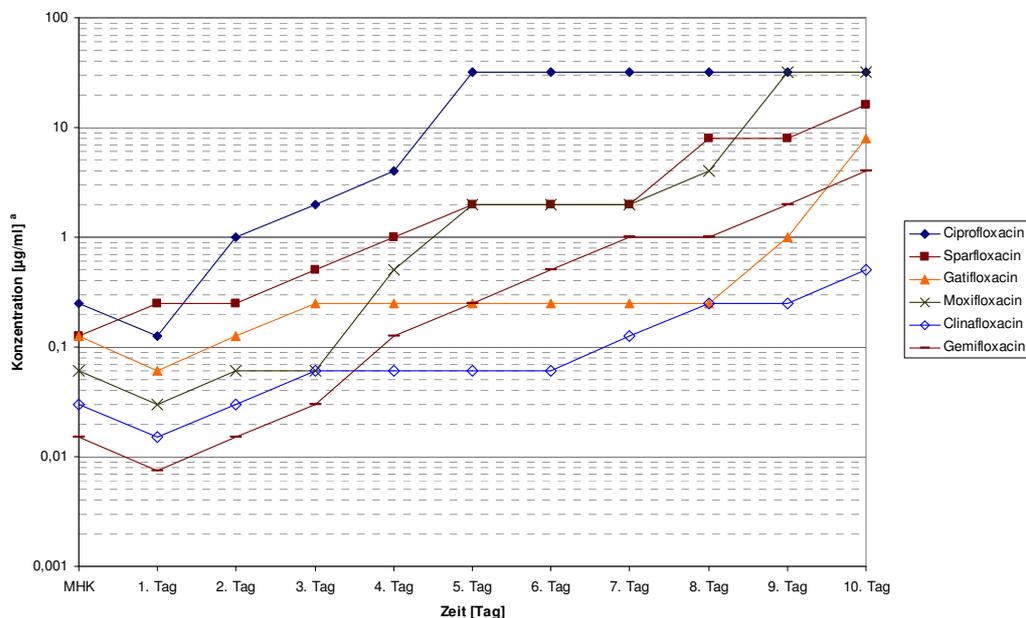


Abbildung 16: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 26

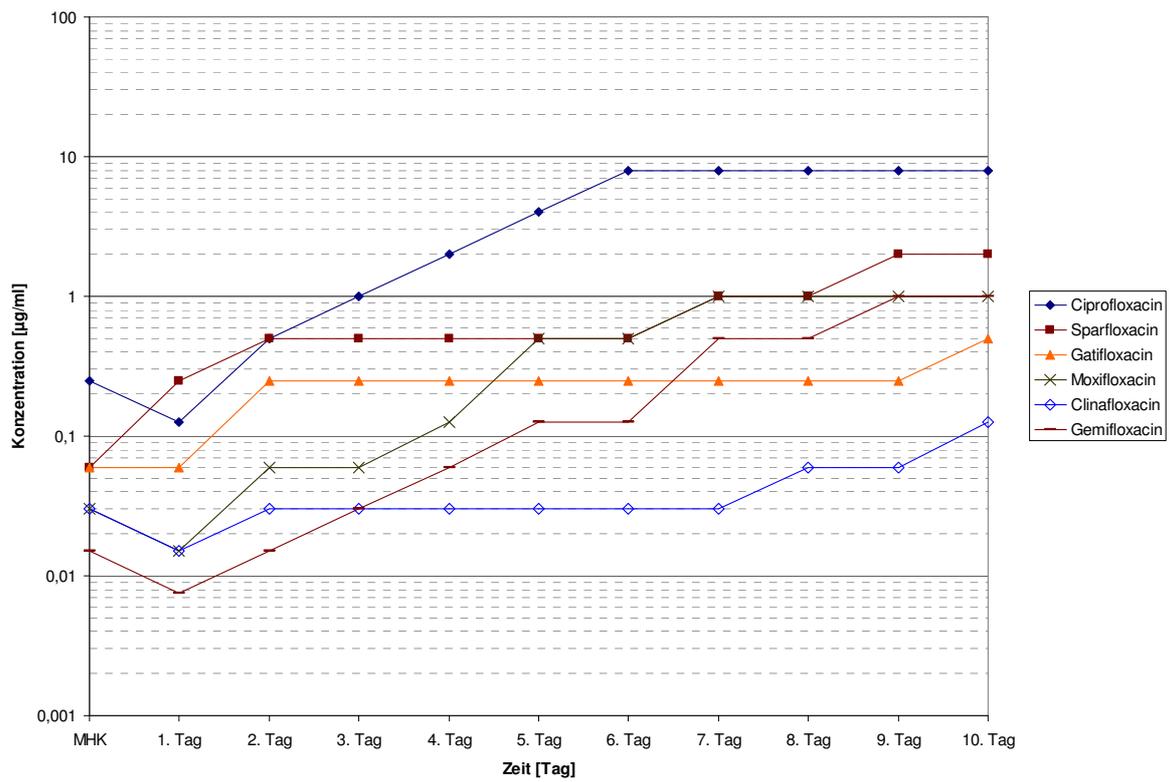


Abbildung 17: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 27

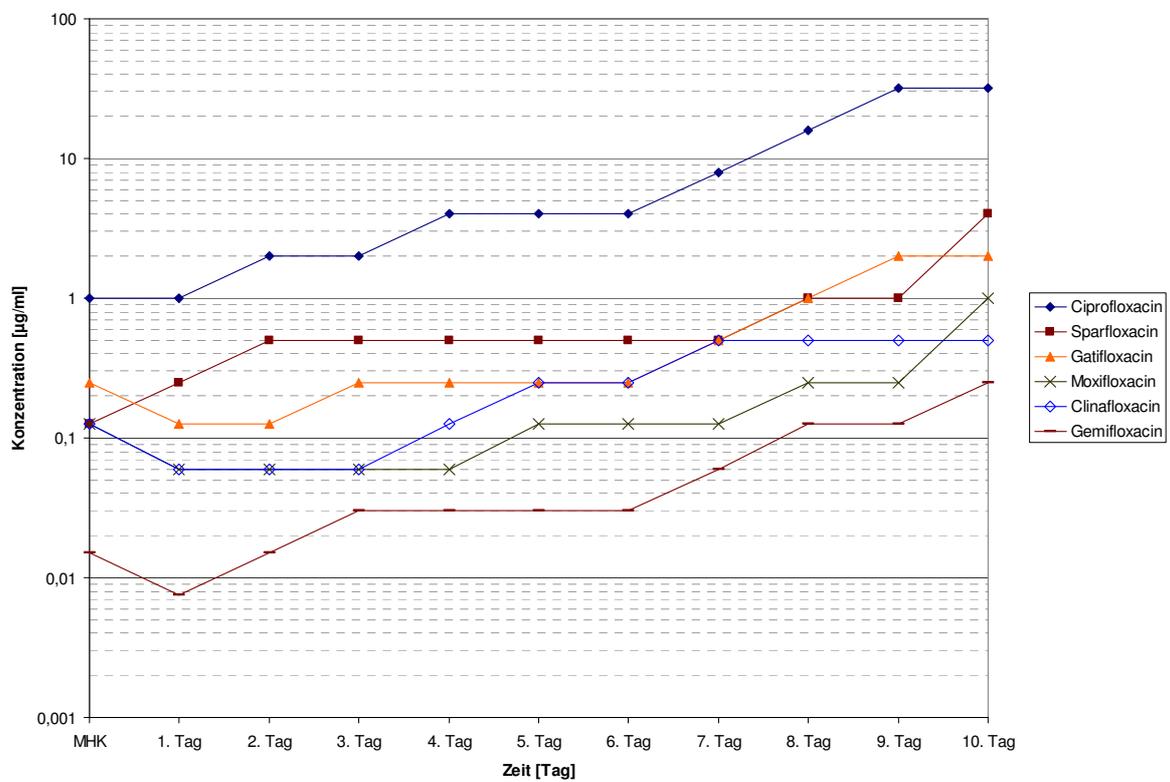


Abbildung 18: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 28

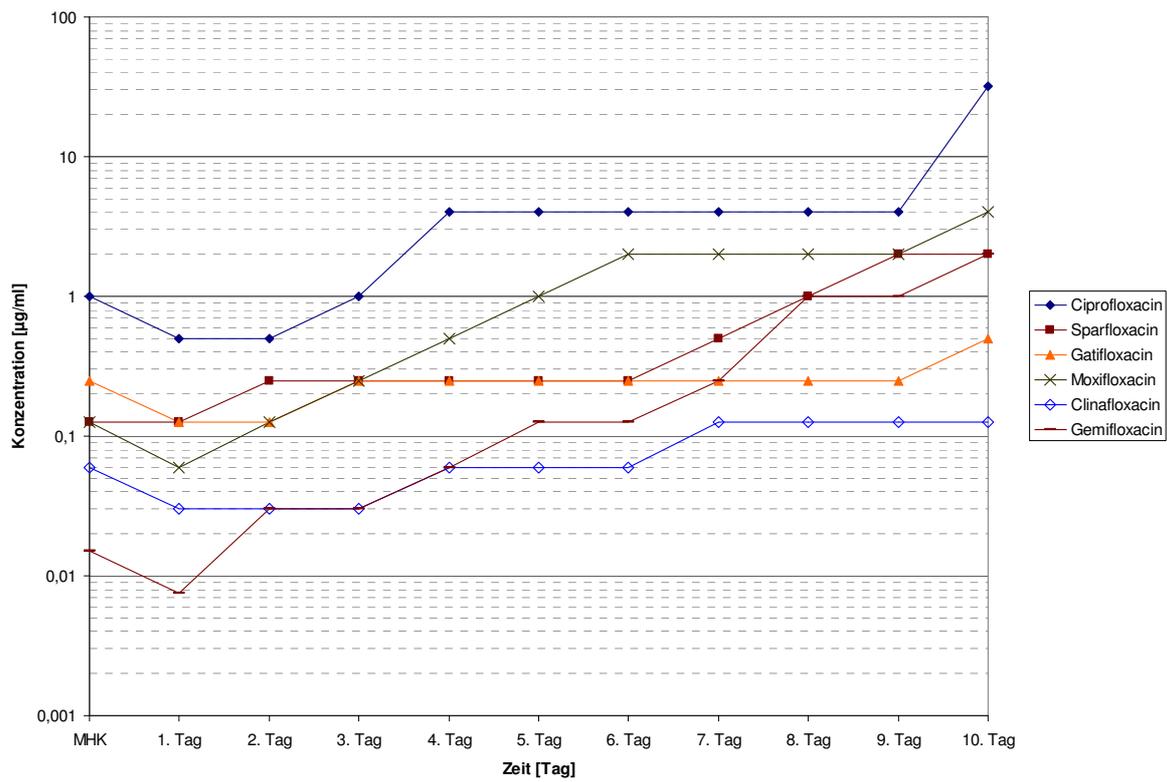


Abbildung 19: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 29

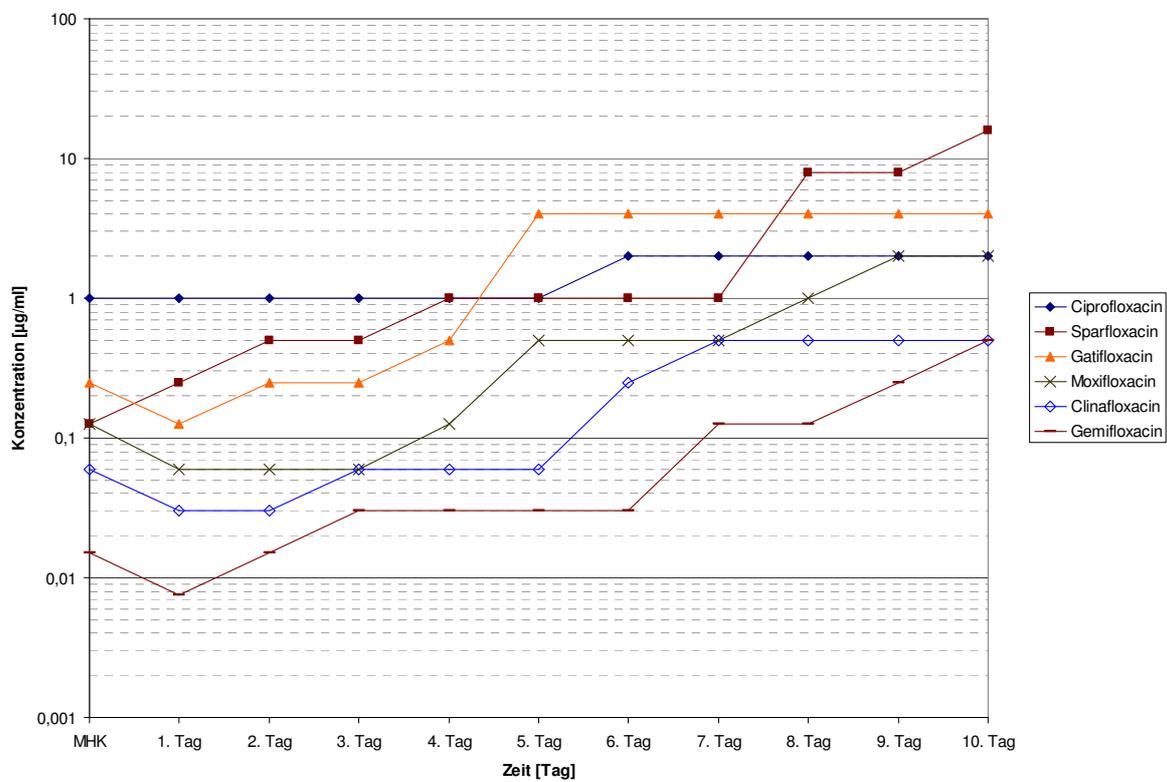


Abbildung 20: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 30

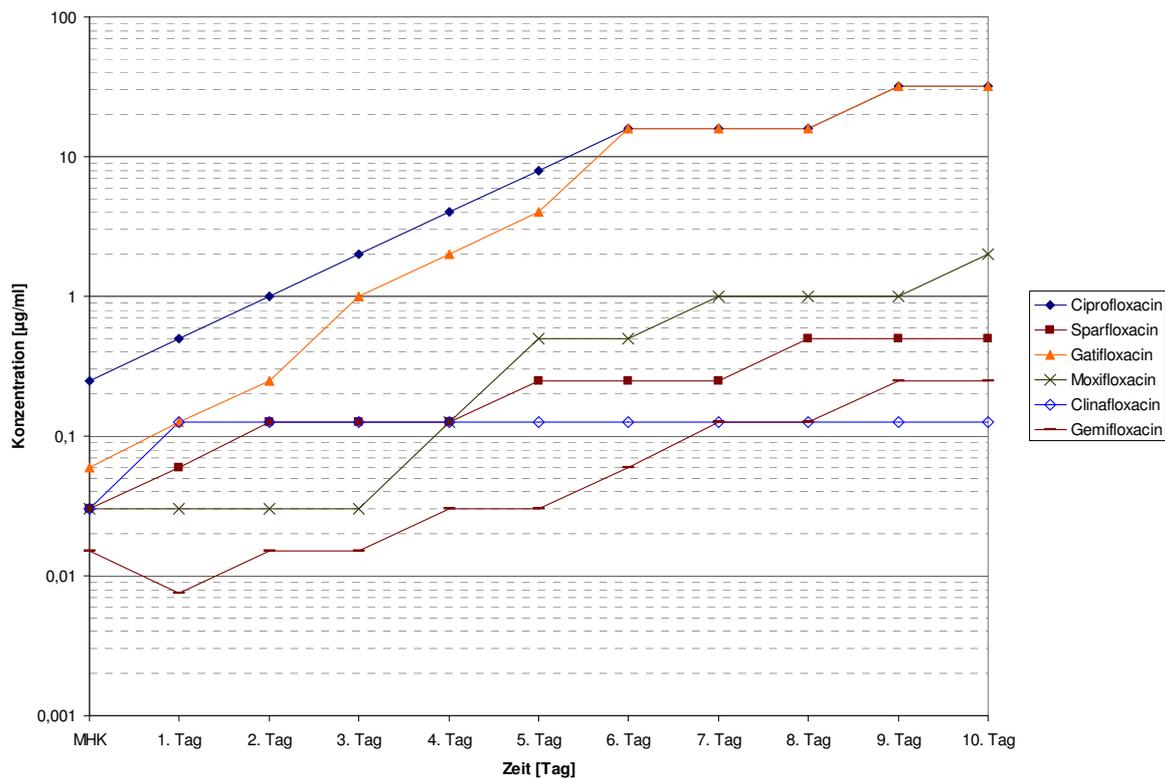


Abbildung 21: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 31

^a Angegeben ist zu Anfang die MHK des jeweiligen Stammes, an den Tagen 1 bis 10 die Konzentration [$\mu\text{g/ml}$], in welcher noch sichtbares Wachstum zu verzeichnen war.

Über den gesamten Zeitraum von zehn Tagen stiegen die MHK-Werte der Pneumokokken von 0,25 – 1 auf 2 – 64 $\mu\text{g/ml}$ in Medium mit Ciprofloxacin, von 0,03 – 0,125 auf 1 – 16 $\mu\text{g/ml}$ mit Sparfloxacin, von 0,06 – 0,25 auf 1 – 64 $\mu\text{g/ml}$ mit Gatifloxacin, von 0,03 – 0,125 auf 1 – 64 $\mu\text{g/ml}$ mit Moxifloxacin, von 0,03 – 0,125 auf 0,5 – 1 $\mu\text{g/ml}$ mit Clinafloxacin und von 0,015 auf 0,25 – 8 $\mu\text{g/ml}$ mit Gemifloxacin. Das entspricht einem Anstieg der MHK-Werte um 1 – 8 Verdünnungsstufen nach der Selektion in subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin, um 5 – 7 Stufen bei Sparfloxacin, um 3 – 10 Stufen bei Gatifloxacin, um 4 – 10 Stufen bei Moxifloxacin, um 3 – 5 Stufen bei Clinafloxacin und einen Anstieg um 4 – 9 Verdünnungsstufen nach der Selektion in Medium, das Gemifloxacin enthielt.

Stamm	Initiale MHK (µg/ ml)						Resistenzselektion		MHK-Werte nach Selektion						Mutationen ^c in der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	AB ^a	Anstieg ^b	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	gyrA	parC
26	0.25	0.125	0.125	0.06	0.03	0.015	Cipro	8	64	8	8	2	0.5	0.5	S81F	S79Y
							Spar	7	32	16	8	2	0.25	0.5	S81Y	S79Y
							Gati	8	32	32	32	16	8	1	S81F	S79Y
							Moxi	10	64	32	64	64	8	8	S81F	S79Y, D83N
							Clina	5	64	16	8	4	1	2	S81F	S79Y
							Gemi	9	32	32	128	32	8	8	S81F	S79Y
27	0.25	0.06	0.06	0.03	0.03	0.015	Cipro	5	8	0.125	0.5	0.06	0.25	0.125	-	-
							Spar	5	4	2	1	0.5	0.125	0.125	S81F	-
							Gati	4	4	0.5	1	0.5	0.25	0.125	-	-
							Moxi	5	16	4	4	1	0.5	0.25	S81F	-
							Clina	4	4	2	1	0.5	0.5	0.125	S81Y	-
							Gemi	7	32	8	64	2	2	2	-	D78N
28	1	0.125	0.25	0.125	0.125	0.015	Cipro	6	64	8	8	2	1	0.5	S81F	S79Y, D83G
							Spar	6	32	8	4	2	0.5	0.25	S81F	D83G
							Gati	5	32	16	8	4	1	0.5	S81F	D83G
							Moxi	5	64	32	16	4	2	2	-	S79Y
							Clina	3	32	8	4	2	1	0.5	S81F	D83N
							Gemi	6	16	4	64	1	2	1	S81F	-
29	1	0.125	0.25	0.125	0.06	0.015	Cipro	6	64	8	8	2	1	0.5	S81F	S79Y, D83G
							Spar	6	8	8	4	2	0.5	0.25	S81F	-
							Gati	3	8	4	2	1	0.5	0.25	-	-
							Moxi	6	64	32	16	8	1	1	S81F	S79F
							Clina	3	4	2	2	1	0.5	0.25	S81F	-
							Gemi	8	16	4	64	2	1	4	S81F	S79Y
30	1	0.125	0.25	0.125	0.06	0.015	Cipro	1	2	0.25	0.5	0.25	0.125	0.06	-	-
							Spar	7	8	16	4	4	0.5	0.5	S81F	S79F
							Gati	4	16	32	4	4	0.5	0.5	S81Y	S79F
							Moxi	4	8	8	4	2	0.25	0.25	S81F	-
							Clina	3	32	16	8	4	0.5	0.5	S81Y	S79F
							Gemi	6	32	8	32	1	0.5	1	-	D83Y
31	0.25	0.03	0.06	0.03	0.03	0.015	Cipro	8	64	4	4	2	0.5	0.5	S81F	S79Y
							Spar	5	2	1	0.5	0.5	0.125	0.06	-	-
							Gati	10	8	8	64	16	4	2	S81F	S79F
							Moxi	7	8	2	4	4	0.25	0.125	S81F	S79A
							Clina	4	2	1	1	0,5	0.5	0.03	S81Y	-
							Gemi	4	8	1	32	1	0.125	0.25	S81F	-

Tabelle 5: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae* (Legende s. nächste Seite)

^a Cipro, Ciprofloxacin; Spar, Sparfloxacin; Gati, Gatifloxacin; Moxi, Moxifloxacin; Clina, Clinafloxacin; Gemi, Gemifloxacin.

^b Anstieg der MHK-Werte vom Originalstamm zu dem chinolonresistenten Stamm, der in chinolonhaltigem Medium herausselektiert wurde, gemessen in Verdünnungsstufen. Zum Beispiel war der MHK-Wert des Originalstammes 1 für Ciprofloxacin 0,25 µg/ml. Nach 10 Tagen in antibiotikahaltigem Medium stieg er auf 64 µg/ml. Das bedeutet einen Anstieg um 8 Verdünnungsstufen.

^c Die Mutationen beziehen sich auf Unterschiede zwischen dem Originalstamm und dem selektierten resistenten Stamm.

Bei der Empfindlichkeitstestung der Mutanten (n=36) gegenüber den jeweils anderen Antibiotika wurde in allen Fällen in gewissem Ausmaß Kreuzresistenz festgestellt. Ciprofloxacin erwies sich als das am wenigsten wirksame Präparat, Gemifloxacin als dasjenige, bei welchem die MHK-Werte am niedrigsten waren. Dazwischen lagen in der Reihenfolge zunehmender Wirksamkeit Sparfloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Clinafloxacin. Basierend auf einem Schwellenwert von ≤ 1 µg/ml, bis zu welchem die Bakterien als sensibel eingestuft werden, wurden von den 36 Mutanten 29 durch Gemifloxacin und ebenso viele durch Clinafloxacin gehemmt, 13 durch Moxifloxacin, sieben durch Gatifloxacin, und sechs Mutanten wurden durch Sparfloxacin inhibiert. Keine Mutante war empfindlich gegenüber Ciprofloxacin.

Es fällt auf, dass die in Gemifloxacin selektierten Mutanten aus Stamm 27 die höchsten MHK-Werte aller Antibiotika innerhalb des Stammes aufweisen. Im Fall von Stamm 31 sind dies mit Ausnahme von Ciprofloxacin die in Gatifloxacin selektierten Mutanten, bei Stamm 28 liefern die Moxifloxacin-Mutanten die Mehrzahl der höchsten MHK-Werte. Auf der anderen Seite liegen die minimalen Hemmkonzentrationen der in Sparfloxacin selektierten Bakterien fast immer unter denen der in anderen Antibiotika entstandenen Mutanten.

Nach der zehntägigen Anzüchtung in subinhibitorischen Chinolonkonzentrationen konnten bei vier der 36 Bakterienstämme keine Mutationen in *gyrA* oder *parC* nachgewiesen werden. Sieben Stämme zeigten eine Einzelmutation in *gyrA*, zwei eine Einzelmutation in *parC*. 16 Stämme wiesen eine Doppelmutation in *gyrA* und *parC* auf, bei drei Bakterien war zusätzlich dazu eine zweite Mutation in *parC* vorhanden. Im Bereich des von *gyrA* kodierten Enzymabschnitts war die Aminosäure Serin an Position 81 gegen Phenylalanin oder Tyrosin ausgetauscht. Als Ergebnis der Sequenzierung des *parC*-Genabschnitts konnten die Aminosäureaustausche Ser79→Tyr, Ser79→Phe, Ser79→Ala sowie Asp83→Asn, Asp83→Gly und Asp83→Tyr festgestellt werden. In einem Fall wurde der Austausch Asp78→Asn detektiert. In den Aminosäuresequenzen des Stammes 29 wurde im *parC*-Bereich zusätzlich der Austausch von Lysin an Position 137 durch Asparagin schon bei dem Wildtyp gefunden.

Stamm	Chinolon ^a	MHK Ciprofloxacin (µg/ml)		
		ohne Reserpin	mit Reserpin	Ratio ^b
26	Wild	0.25	0.25	0
	Cipro	64	64	0
	Spar	16	16	0
	Gati	32	16	1
	Moxi	64	64	0
	Clina	64	64	0
	Gemi	32	32	0
27	Wild	0.25	0.06	2
	Cipro	8	1	3
	Spar	4	2	1
	Gati	4	0.5	3
	Moxi	16	8	1
	Clina	4	0.5	3
	Gemi	32	1	5
28	Wild	1	0.25	2
	Cipro	64	32	1
	Spar	32	16	1
	Gati	32	32	0
	Moxi	64	32	1
	Clina	32	4	3
	Gemi	16	1	4
29	Wild	1	0.25	2
	Cipro	64	16	2
	Spar	8	1	3
	Gati	8	0.5	4
	Moxi	64	0.5	5
	Clina	4	0.25	4
	Gemi	16	1	4
30	Wild	1	0.125	3
	Cipro	2	0.125	4
	Spar	8	4	1
	Gati	16	8	1
	Moxi	8	2	2
	Clina	32	16	1
	Gemi	32	4	3
31	Wild	0.25	0.125	1
	Cipro	64	32	1
	Spar	2	1	1
	Gati	8	4	1
	Moxi	8	2	2
	Clina	2	1	1
	Gemi	8	1	3

Tabelle 6: Ergebnisse des Reserpintests der selektierten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*

^a angegeben ist das Chinolon, in welchem die Mutante selektiert wurde.

^b die Ratio drückt aus, um wie viele Verdünnungsstufen der MHK-Wert mit Reserpin gegenüber dem ohne Reserpin gesunken ist.

Alle Wildtypstämme (n=6) und alle Mutanten (n= 36) wurden auf Effluxaktivität getestet. Dabei verringerte Reserpin den MHK-Wert für Ciprofloxacin um bis zu 4 Verdünnungsstufen, wobei sich die einzelnen Stämme unterschiedlich verhalten. Aus

Stamm 26 zeigt nur die in Gatifloxacin selektierte Mutante eine MHK-Reduktion um eine Verdünnungsstufe, während bei den aus Stamm 29 selektierten Mutanten die MHK-Werte bei Anwesenheit von Reserpin zwischen 2 und 5 Stufen niedriger lagen (s. Tabelle 6). Die in Sparfloxacin selektierten Mutanten zeigen im Schnitt die geringste Effluxaktivität, die in Gemifloxacin mutierten Bakterien weisen den höchsten Einfluss von Efflux auf.

3.2.2 STREPTOCOCCUS PYOGENES

Die MHK-Werte der A-Streptokokken stiegen über den Zeitraum von zehn Tagen von 0,125 – 2 auf 2 – 32 µg/ml in Medium mit Ciprofloxacin, von 0,06 – 0,5 auf 4 – 32 µg/ml mit Sparfloxacin, von 0,06 – 0,5 auf 1 – 4 µg/ml mit Gatifloxacin, von 0,06 – 0,25 auf 1 – 16 µg/ml mit Moxifloxacin, von 0,03 – 0,06 auf 0,125 – 4 mit Clinafloxacin, und von 0,03 – 0,06 auf 0,25 – 2 in Medium, das Gemifloxacin enthielt. Das entspricht einem Anstieg der MHK-Werte um 2 – 7 Verdünnungsstufen nach der Selektion in subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin, um 4 – 9 Stufen bei Sparfloxacin, um 2 – 6 Stufen bei Gatifloxacin, um 3 – 8 Stufen bei Moxifloxacin, um 1 – 6 Stufen bei Clinafloxacin, und einen Anstieg von 3 – 6 Verdünnungsstufen nach der Selektion in Medium, das Gemifloxacin enthielt.

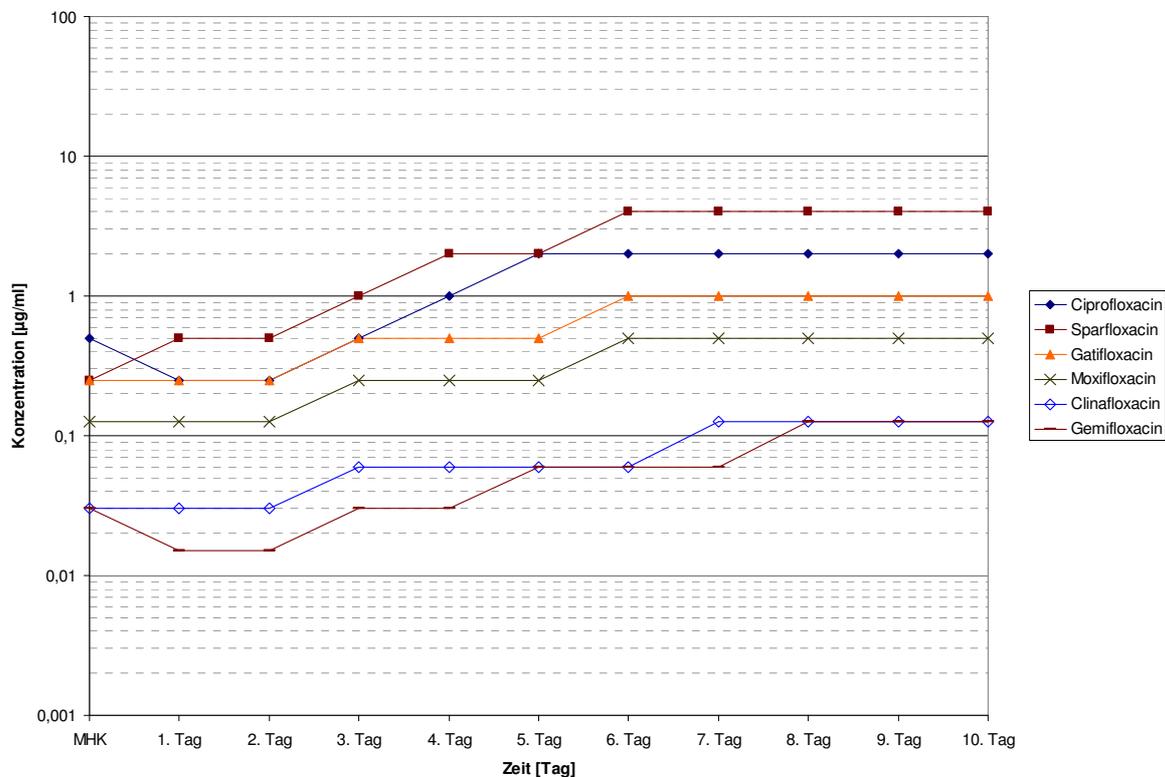


Abbildung 22: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 1

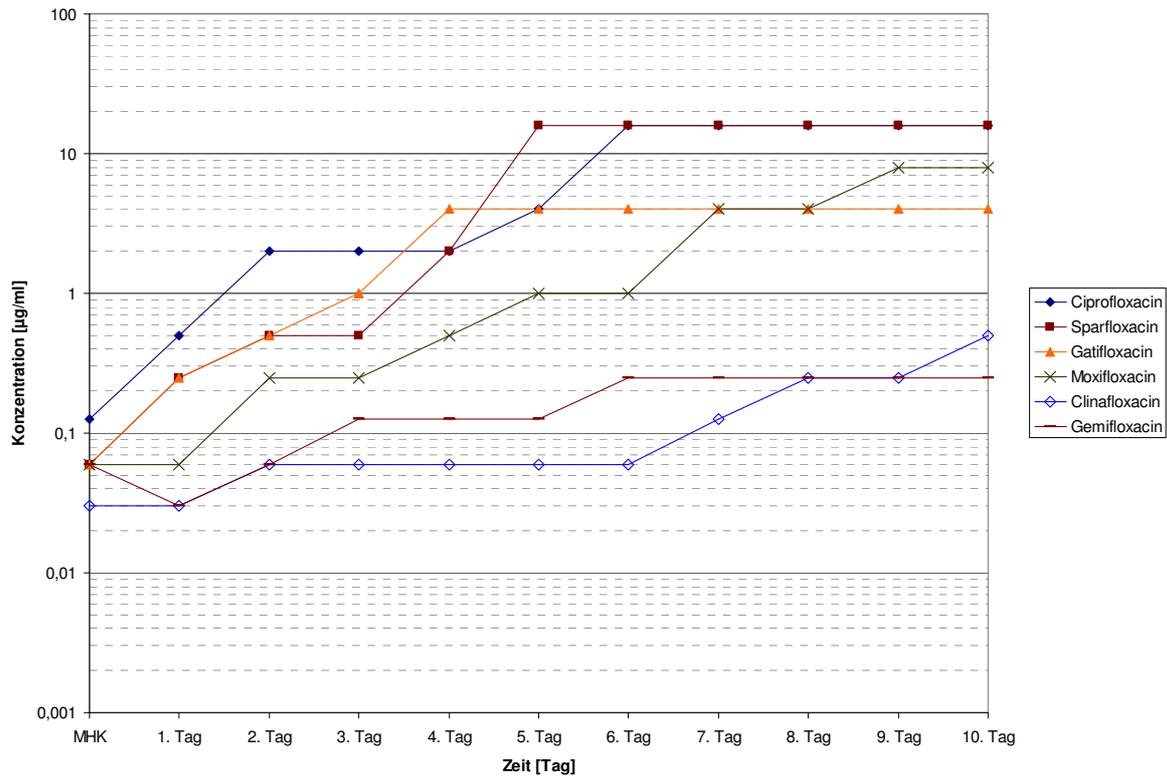


Abbildung 23: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 2

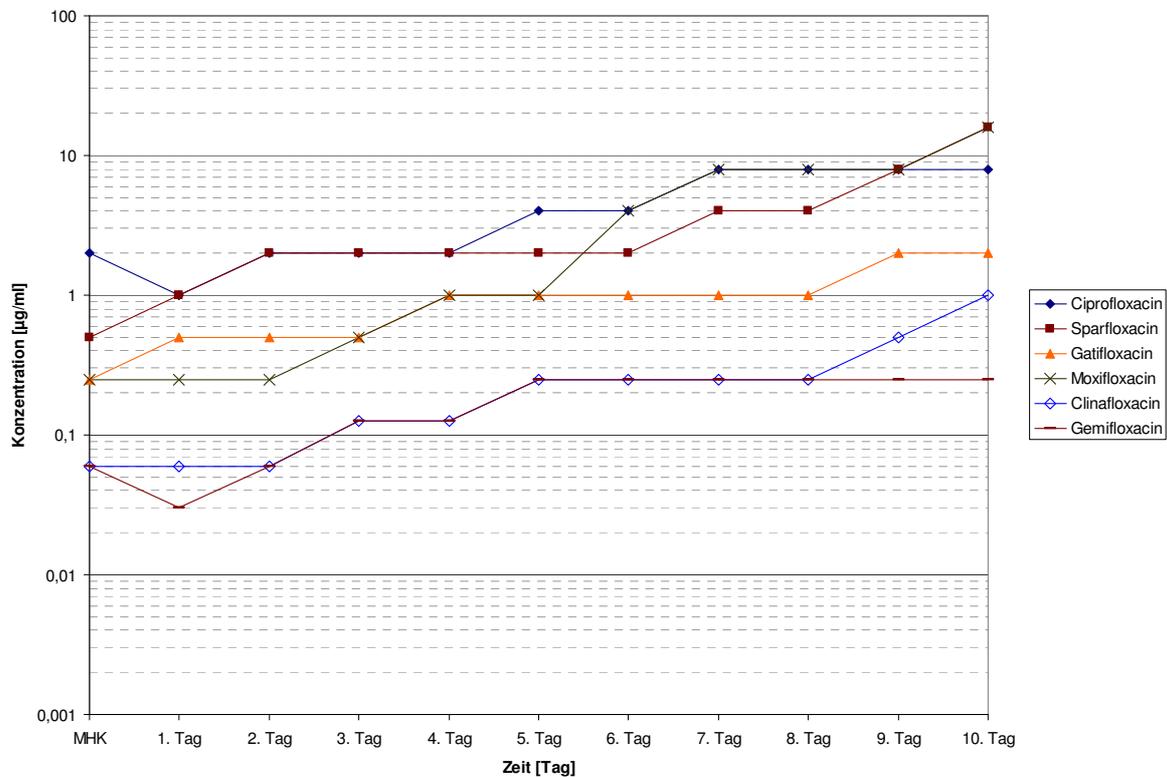


Abbildung 24: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 3

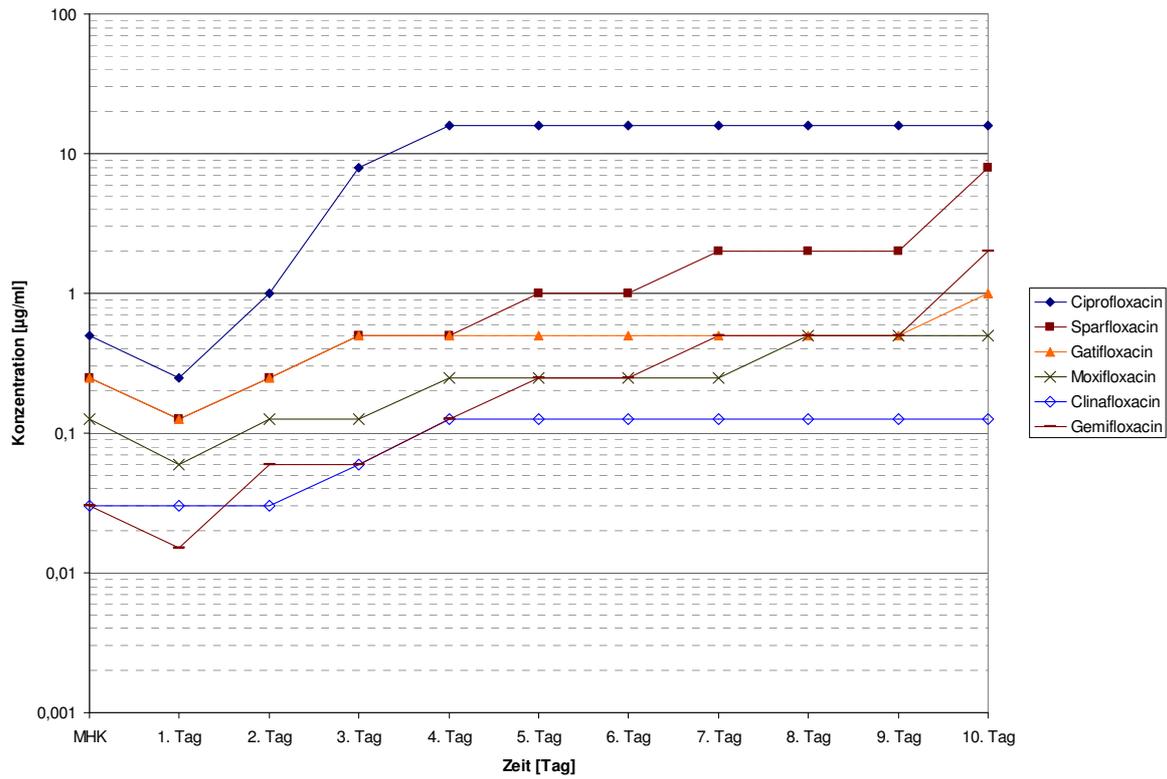


Abbildung 25: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 4

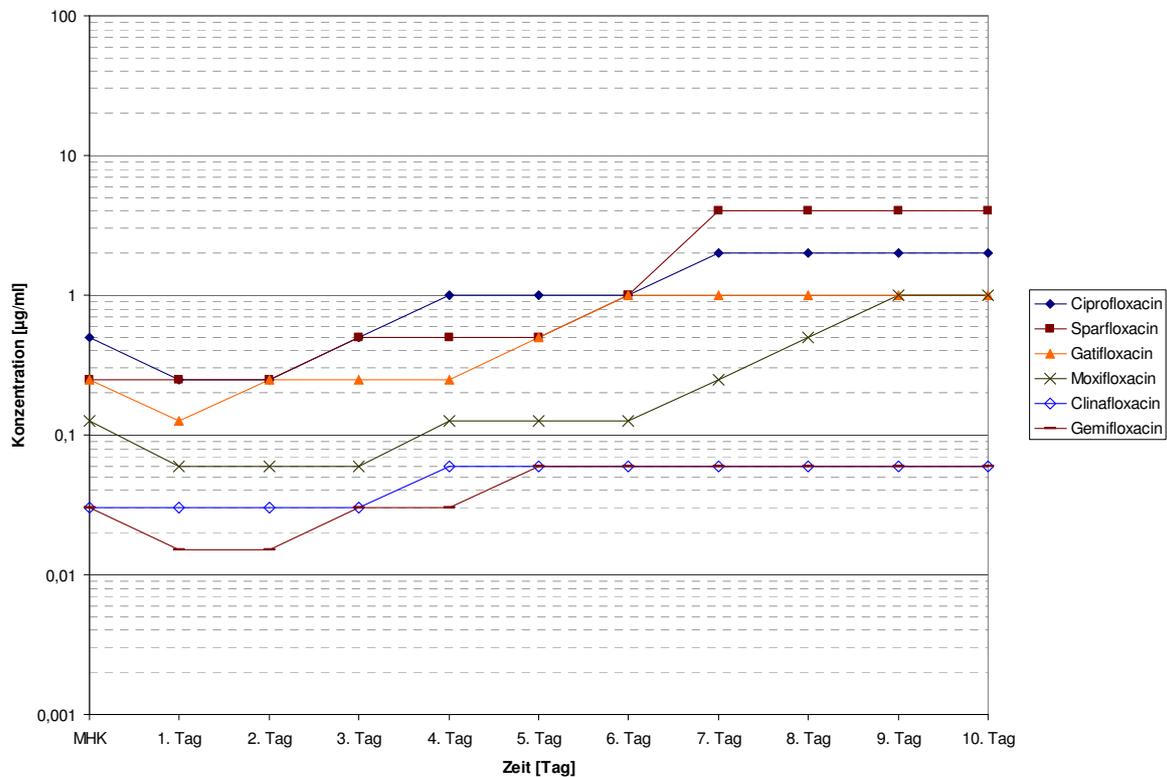


Abbildung 26: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 5

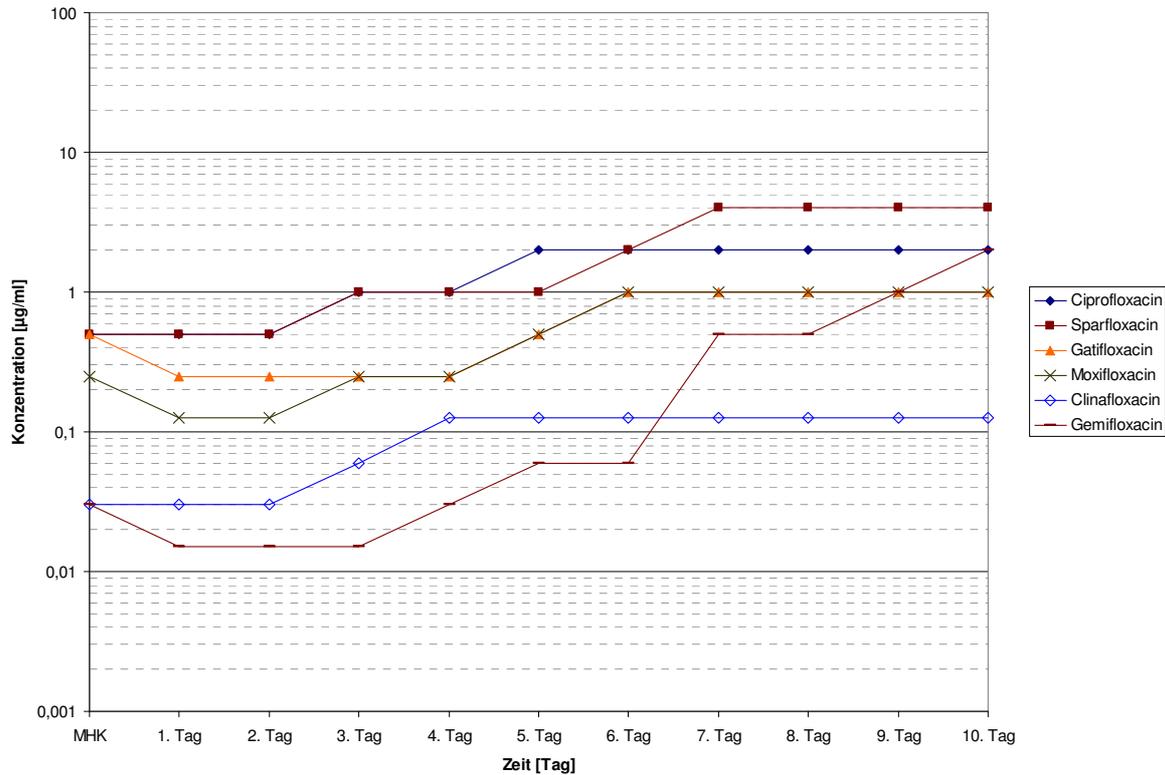


Abbildung 27: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pyogenes* Stamm 6

Die selektierten Mutanten wurden auf ihre Resistenz gegenüber den jeweils anderen Antibiotika untersucht. Wie bei den Pneumokokken stellte sich Ciprofloxacin als der am wenigsten wirksame sowie Gemifloxacin als der potenteste Wirkstoff heraus. Dazwischen rangierten in der Reihenfolge zunehmender Wirksamkeit Sparfloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Clinafloxacin.

Ausgehend von einem Grenzwert der Chinolonempfindlichkeit von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ waren 34 der 36 Mutanten als resistent gegenüber Ciprofloxacin einzustufen. Im Falle von Sparfloxacin sind es noch 32, 19 Mutanten waren resistent gegenüber Moxifloxacin. Gegen jeweils sechs der 36 Mutanten zeigten Clinafloxacin und Gemifloxacin keine ausreichende Wirksamkeit.

Der Verlauf der Resistenzentwicklung der *Streptococcus pyogenes*-Isolate ist grafisch in den Abbildungen 22 – 27 dargestellt. Die MHK-Werte der selektierten Mutanten sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Stamm	InitialeMHK (µg/ ml)						Resistenzselektion		MHK-Werte nach Selektion					
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	AB ^a	Anstieg ^b	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi
1	0.5	0.25	0.25	0.125	0.03	0.03	Cipro	2	2	1	1	0.5	0.125	0.06
							Spar	5	4	8	1	0.5	0.125	0.25
							Gati	3	2	4	2	1	0.25	0.125
							Moxi	3	2	4	1	1	0.25	0.125
							Clina	3	1	1	0.5	0.5	0.25	0.06
							Gemi	3	2	4	1	2	0.25	0.25
2	0.125	0.06	0.06	0.06	0.03	0.06	Cipro	7	16	16	4	2	0.5	0.25
							Spar	9	16	32	16	8	2	2
							Gati	6	16	16	4	4	0.5	0.5
							Moxi	8	16	32	32	16	4	4
							Clina	4	8	8	4	2	0.5	0.125
							Gemi	3	8	4	2	2	0.25	0.5
3	2	0.5	0.25	0.25	0.06	0.06	Cipro	2	8	4	2	2	0.5	0.125
							Spar	4	8	8	4	2	0.5	0.5
							Gati	4	16	8	4	2	1	0.25
							Moxi	6	32	64	16	16	2	2
							Clina	6	32	64	32	16	4	1
							Gemi	5	16	32	4	8	0.5	2
4	0.5	0.25	0.25	0.125	0.06	0.03	Cipro	6	32	32	4	4	0.5	0.5
							Spar	7	16	32	4	4	0.5	0.5
							Gati	2	2	2	1	1	0.25	0.125
							Moxi	3	2	2	1	1	0.125	0.125
							Clina	1	2	1	0.5	0.5	0.125	0.06
							Gemi	6	16	16	8	8	2	2
5	0.5	0.25	0.25	0.125	0.03	0.03	Cipro	2	2	2	1	1	0.25	0.06
							Spar	4	4	4	4	1	0.25	0.25
							Gati	2	2	4	1	1	0.125	0.25
							Moxi	4	4	16	2	2	0.25	1
							Clina	2	1	1	0.5	0.25	0.125	0.125
							Gemi	3	4	2	1	1	0.25	0.25
6	0.5	0.5	0.5	0.25	0.03	0.03	Cipro	3	4	1	1	0.5	0.25	0.06
							Spar	4	8	8	1	1	0.25	0.25
							Gati	2	4	2	2	1	0.25	0.125
							Moxi	3	4	2	2	2	0.25	0.125
							Clina	3	4	4	2	1	0.25	0.25
							Gemi	6	16	32	8	8	2	2

Tabelle 7: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von *Streptococcus pyogenes* (Legende s. nächste Seite)

^a Cipro, Ciprofloxacin; Spar, Sparfloxacin; Gati, Gatifloxacin; Moxi, Moxifloxacin; Clina, Clinafloxacin; Gemi, Gemifloxacin.

^b Anstieg der MHK-Werte vom Originalstamm zu dem chinolonresistenten Stamm, der in chinolonhaltigem Medium herausselektioniert wurde, gemessen in Verdünnungsstufen. Zum Beispiel war der MHK-Wert des Originalstammes 1 für Ciprofloxacin 0,25 µg/ml. Nach 10 Tagen in antibiotikahaltigem Medium stieg er auf 64 µg/ml. Das bedeutet einen Anstieg um 8 Verdünnungsstufen.

Stamm	Chinolon ^a	MHK Ciprofloxacin (µg/ml)		
		ohne Reserpin	mit Reserpin	Ratio ^b
1	Wild	0.5	0.5	0
	Cipro	2	1	1
	Spar	4	4	0
	Gati	2	2	0
	Moxi	2	2	0
	Clina	1	0.5	1
	Gemi	2	2	0
2	Wild	0.125	0.125	0
	Cipro	16	8	1
	Spar	16	8	1
	Gati	16	16	0
	Moxi	16	8	1
	Clina	8	8	0
	Gemi	8	4	1
3	Wild	2	2	0
	Cipro	8	8	0
	Spar	8	4	1
	Gati	16	8	1
	Moxi	32	32	0
	Clina	32	32	0
	Gemi	16	16	0
4	Wild	0.5	0.5	0
	Cipro	32	32	0
	Spar	16	8	1
	Gati	2	1	1
	Moxi	2	1	1
	Clina	2	2	0
	Gemi	16	16	0
5	Wild	0.5	0.5	0
	Cipro	2	2	0
	Spar	4	4	0
	Gati	2	2	0
	Moxi	4	4	0
	Clina	1	1	0
	Gemi	4	4	0
6	Wild	0.5	0.5	0
	Cipro	4	2	1
	Spar	8	8	0
	Gati	4	2	1
	Moxi	4	2	1
	Clina	4	2	1
	Gemi	16	2	3

Tabelle 8: Ergebnisse des Reserpintest der *Streptococcus pyogenes*-Mutanten
(Legende s. nächste Seite)

^a angegeben ist das Chinolon, in welchem die Mutante selektiert wurde.

^b die Ratio drückt aus, um wie viele Verdünnungsstufen der MHK-Wert mit Reserpin gegenüber dem ohne Reserpin gesunken ist.

Die Untersuchung der Effluxaktivität bei *Streptococcus pyogenes* ergab keinen nennenswerten Einfluss von Reserpin auf das Resistenzniveau. In Anwesenheit des Effluxhemmstoffes war der MHK-Wert entweder gleich demjenigen ohne Effluxhemmung oder er lag nur eine Verdünnungsstufe darunter. Lediglich bei einer auf Gemifloxacin selektierten Mutante macht sich die Blockierung der Effluxpumpe in einer Erniedrigung des MHK-Wertes um drei Verdünnungsstufen bemerkbar.

3.3 IN VITRO-RESISTENZENTWICKLUNG BEI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*-ISOLATEN MIT VERMINDERTER CIPROFLOXACIN-EMPFINDLICHKEIT

In der letzten Versuchsanordnung wurden drei *Streptococcus pneumoniae*-Stämme mit erhöhten MHK-Werten und definierten Mutationen für zehn Tage subinhibitorischen Chinolonkonzentrationen ausgesetzt. Zwei Originalstämme (Stämme 32 und 33) hatten eine Einzelmutation in *parC* (Ser79Tyr bzw. Ser79Phe), ein Originalstamm (Stamm 34) wies eine Doppelmutation in *parC* und *gyrA* auf (Ser79Tyr in *parC* und Ser81Phe in *gyrA*). Die jeweiligen MHK-Werte vor und nach den zehn Tagen sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Die minimalen Hemmkonzentrationen für das jeweils selektierende Antibiotikum stiegen von 2 – 32 auf 64 – 256 µg/ml bei den in mit Ciprofloxacin versetztem Medium gezüchteten Bakterien an, von 0,06 – 4 auf 32 – 64 µg/ml in Sparfloxacin, von 0,125 – 4 auf 8 – 64 µg/ml in Gatifloxacin, von 0,03 – 2 auf 8 – 64 µg/ml in Moxifloxacin, von 0,03 – 0,125 auf 4 – 16 µg/ml in Clinafloxacin und von 0,015 – 0,125 auf 1 – 2 µg/ml bei den Bakterien, die in Gemifloxacin selektiert worden waren.

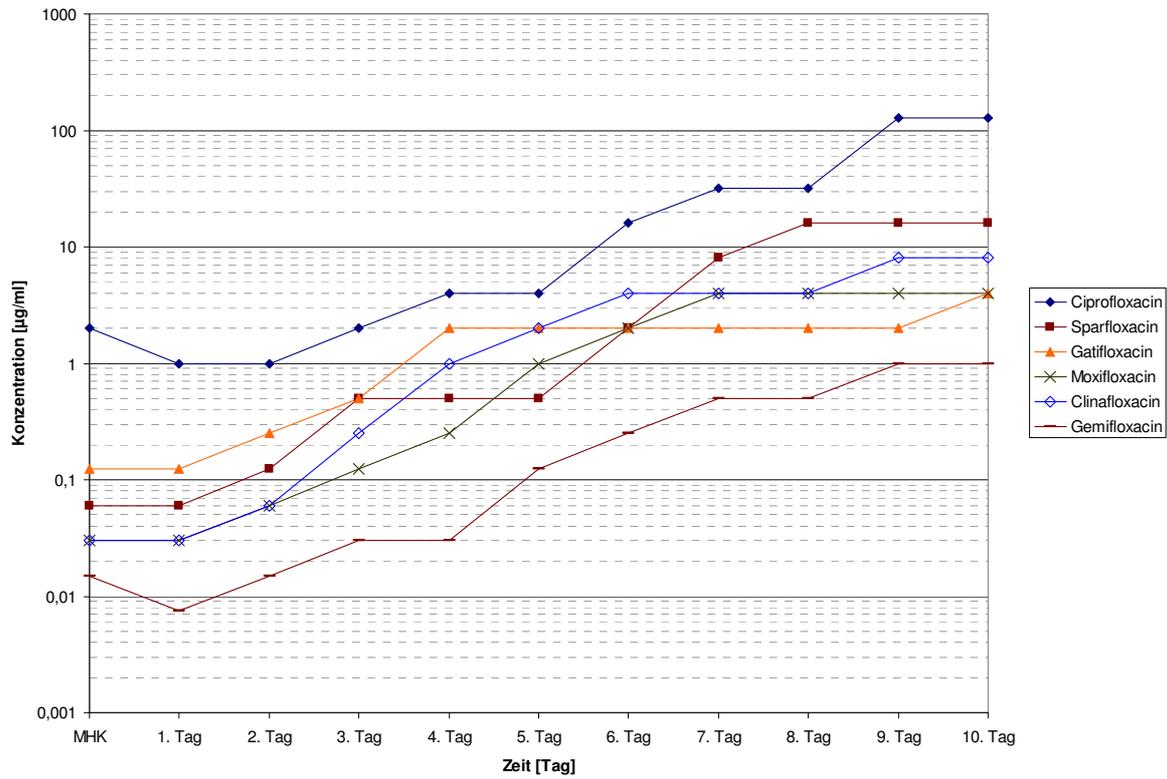


Abbildung 28: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 32

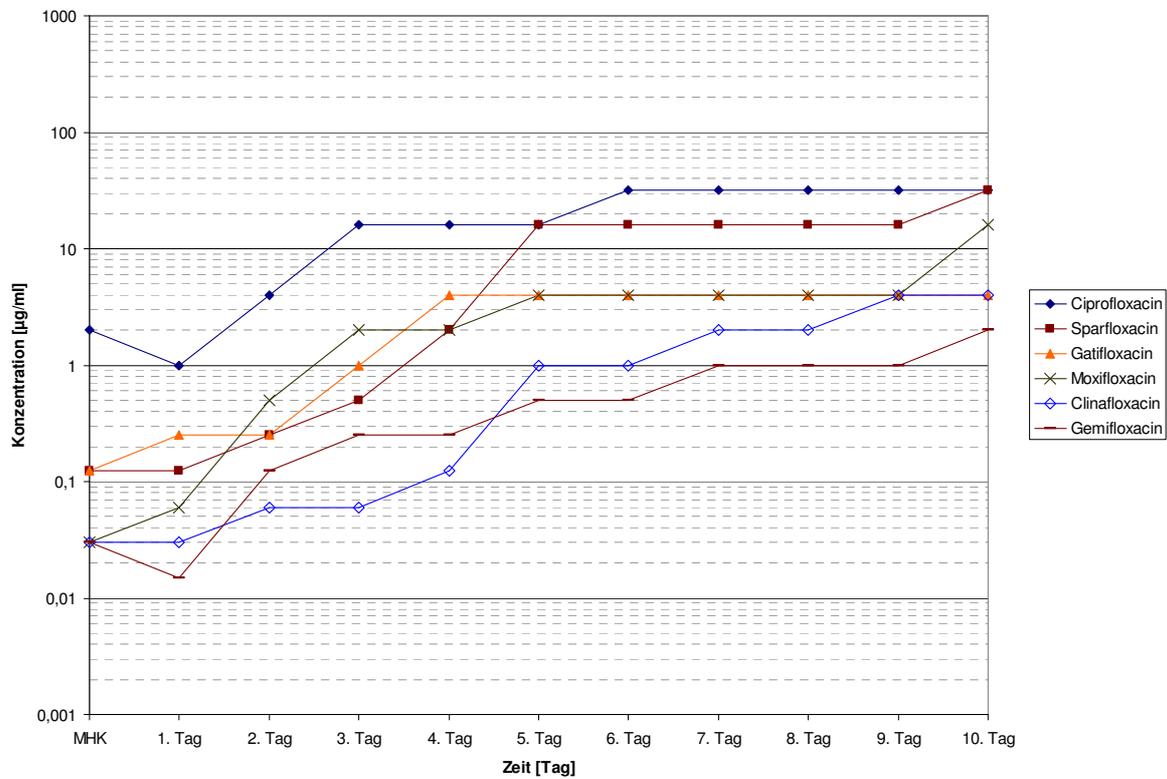


Abbildung 29: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 33

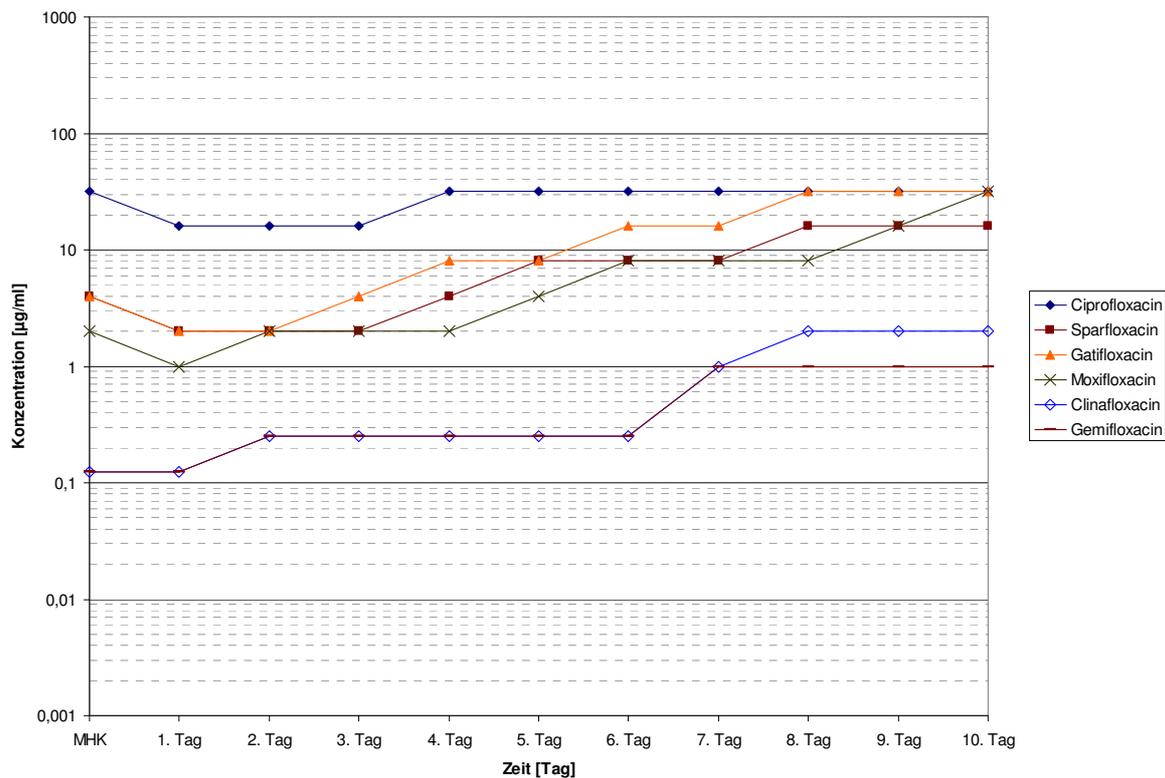


Abbildung 30: Resistenzentwicklung von *Streptococcus pneumoniae* Stamm 34

Die Wirksamkeit der einzelnen Antibiotika stellt sich in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Versuchsergebnissen wie folgt dar: Ciprofloxacin war das am wenigsten, Gemifloxacin das am besten wirksame Chinolon. Dazwischen lagen in der Reihenfolge verbesserter Aktivität Sparfloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin sowie Clinafloxacin. Legt man den Grenzwert von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ für die Resistenz eines Bakteriums zugrunde, hemmten Clinafloxacin und Gemifloxacin jeweils zehn von 18 Mutanten, während die anderen Chinolone keine der mutierten Bakterien am Wachstum hinderten.

Zwei der Originalstämme hatten jeweils eine Mutation in der QRDR des *parC*-Genbereichs, welche zu einem Aminosäureaustausch von Serin an Position 79 zu Tyrosin (Stamm 32) bzw. Phenylalanin (Stamm 33) führten und so für die verminderte Ciprofloxacin-Empfindlichkeit verantwortlich waren. Der verbleibende Stamm wies eine Doppelmutation in *parC* (Ser79→Tyr) und *gyrA* (Ser81→Phe) auf. Entsprechend lagen die anfänglichen MHK-Werte höher.

Stamm ^d	Initiale MHK (µg/ml)						Resistenzselektion		MHK-Werte nach Selektion						Mutationen ^c in der QRDR von	
	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	AB ^a	Anstieg ^b	Cipro	Spar	Gati	Moxi	Clina	Gemi	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
32	2	0.06	0.125	0.03	0.03	0.015	Cipro	7	256	8	16	8	2	1	S81F	S79Y
							Spar	9	32	32	8	16	1	1	S81F	S79Y
							Gati	6	64	16	8	8	2	1	S81F	S79Y
							Moxi	8	32	32	8	8	1	1	S81F	S79Y
							Clina	9	128	64	128	64	16	8	S81F	S79Y
							Gemi	6	32	32	16	16	2	1	S81F	S79Y
33	2	0.125	0.125	0.03	0.03	0.03	Cipro	5	64	16	8	8	1	0.5	S81F	S79F
							Spar	9	64	64	8	16	1	1	S81Y	S79F
							Gati	6	32	32	8	4	1	0.5	S81Y	S79F
							Moxi	9	32	32	8	16	1	1	S81F	S79F
							Clina	8	128	32	32	32	8	16	S81F	S79F
							Gemi	6	32	32	8	8	1	2	S81F	S79F
34	32	4	4	2	0.125	0.125	Cipro	1	64	16	8	8	1	0.25	S81F	S79Y
							Spar	3	64	32	16	16	1	2	S81F	S79Y
							Gati	4	32	32	64	128	32	8	S81F	S79Y
							Moxi	5	32	32	64	64	8	4	S81F	S79Y
							Clina	5	64	32	32	32	4	4	S81F	S79Y
							Gemi	4	64	32	16	16	1	2	S81F	S79Y

Tabelle 9: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*

^a Cipro, Ciprofloxacin; Spar, Sparfloxacin; Gati, Gatifloxacin; Moxi, Moxifloxacin; Clina, Clinafloxacin; Gemi, Gemifloxacin.

^b Anstieg der MHK-Werte vom Originalstamm zu dem chinolonresistenten Stamm, der in chinolonhaltigem Medium herausselektiert wurde, gemessen in Verdünnungsstufen. Zum Beispiel war der MHK-Wert des Originalstammes 1 für Ciprofloxacin 0,25 µg/ml. Nach 10 Tagen in antibiotikahaltigem Medium stieg er auf 64 µg/ml. Das bedeutet einen Anstieg um 8 Verdünnungsstufen.

^c Die Mutationen beziehen sich auf Unterschiede zwischen dem Originalstamm und dem selektionierten resistenten Stamm, mit Ausnahme der unten aufgeführten Mutationen, die schon in den Anfangsstämmen vorhanden waren

^d Stamm 32: Initiale Mutation *parC* S79Y

Stamm 33: Initiale Mutation *parC* S79F

Stamm 34: Initiale Mutationen *gyrA* S81F, *parC* S79Y

Nachdem diese Stämme zehn Tage lang antibiotikahaltigem Medium ausgesetzt waren, kamen bei den ersten beiden Stämmen Mutationen in *gyrA* dazu: Ser81→Phe bei dem ersten sowie Ser81→Phe oder Ser81→Tyr bei dem zweiten. Bei dem dritten Stamm wurde keine neue Mutation gefunden.

Stamm	Chinolon ^a	MHK Ciprofloxacin (µg/ml)		
		ohne Reserpin	mit Reserpin	Ratio ^b
32	Wild	2	2	0
	Cipro	256	32	3
	Spar	32	8	2
	Gati	64	8	3
	Moxi	32	16	1
	Clina	128	16	3
	Gemi	32	16	1
33	Wild	2	0,5	2
	Cipro	64	8	3
	Spar	64	8	3
	Gati	32	4	3
	Moxi	32	8	2
	Clina	128	8	4
	Gemi	32	2	4
34	Wild	32	16	1
	Cipro	64	16	2
	Spar	64	32	1
	Gati	32	16	1
	Moxi	32	16	1
	Clina	64	16	2
	Gemi	64	16	2

Tabelle 10: Ergebnisse des Reserpintests der selektierten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*

^a angegeben ist das Chinolon, in welchem die Mutante selektiert wurde.

^b die Ratio drückt aus, um wie viele Verdünnungsstufen der MHK-Wert mit Reserpin gegenüber dem ohne Reserpin gesunken ist.

Bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen mit Reserpin waren bei zwei von drei Originalstämmen die Werte ein bzw. zwei Verdünnungsstufen niedriger als ohne Reserpin. Nach zehntägiger Anzüchtung in antibiotikahaltigem Medium zeigten alle Bakterien Efflux. Die MHK-Werte der Mutanten verminderten sich um 2 – 3 Stufen im Fall der in Ciprofloxacin selektierten Bakterien, um 1 – 3 Stufen bei Sparfloxacin und Gatifloxacin, um 1 – 2 Stufen bei Moxifloxacin, um 2 – 4 Stufen bei den Clinafloxacin-Mutanten und um 1 – 4 Stufen bei den Bakterien, bei welchen Gemifloxacin das selektierende Antibiotikum war.

4. DISKUSSION

Streptococcus pneumoniae gehört zu den bedeutendsten humanpathogenen Infektionserregern. Pneumokokken sind die häufigste Ursache für die ambulant erworbene Pneumonie sowie (neben Meningokokken) für die bakterielle Meningitis. Auch bei bakteriellen Sinusitiden und Otitiden werden sie oft gefunden, so dass sie als Leitkeime für Infektionen der oberen Atemwege eingestuft werden. Als solche sind sie auch für die Empfehlungen der entsprechenden Fachgesellschaften zur empirischen Therapie von Bedeutung. Änderungen im Resistenzprofil führen zur Veränderung der Therapieempfehlungen. Da die Resistenz von Pneumokokken gegen Penicillin und andere β -Laktam-Antibiotika sowie gegen eine Reihe von weiteren antibakteriellen Chemotherapeutika seit einigen Jahrzehnten weltweit zunimmt, werden die Fluorchinolone der dritten und vierten Generation mit verbessertem Wirkungsspektrum gegen grampositive Erreger als potente Alternative angesehen. Allerdings wurden in letzter Zeit auch in dieser Stoffklasse Resistenzen gefunden.

Die Viridans-Streptokokken rücken seit einiger Zeit wieder in den Mittelpunkt des Interesses als Erreger von nosokomialen Bakteriämien, während ihre Rolle bei der Ätiologie der bakteriellen Endokarditis schon seit längerem bekannt ist. Janoir *et al.*⁴⁹ zeigten, dass Viridans-Streptokokken genetisches Material, das für die Fluorchinolon-Resistenz verantwortlich ist, *in vitro* auf Pneumokokken übertragen können, wobei die Bedeutung dieser Tatsache *in vivo* noch näher untersucht werden muss. Aus diesem Grund wurden *S. mitis* und *S. sanguis* in die vorliegende Untersuchung einbezogen. Über die Fluorchinolon-Resistenz bei *S. pyogenes*, der die Ursache für eine Reihe von weiteren wichtigen Infektionskrankheiten des Menschen darstellt, gibt es zurzeit noch wenige Informationen. Die meisten Untersuchungen sprechen von guter *in vitro* Aktivität der Gyrasehemmer gegen die A-Streptokokken, es mehrten sich jedoch Berichte über Resistenzen bzw. Multiresistenzen^{4, 6, 100}.

Aus diesem Grund ist es überaus wichtig, die Empfindlichkeit der Bakterien zu überwachen und die Resistenzentwicklung zu erforschen, um Strategien zu entwickeln, wie man die gute Aktivität der Fluorchinolone bewahren kann.

Die minimalen Hemmkonzentrationen von 427 klinischen *Streptococcus pneumoniae*-Isolaten, 54 *Streptococcus mitis*-Isolaten und 31 *Streptococcus sanguis*-Isolaten aus 20 europäischen Universitätskliniken wurden ermittelt. Die Einstufung in resistente und sensible Stämme erfolgte in Anlehnung an die vom Normenausschuss Medizin festgelegten Grenzwerte für Ciprofloxacin von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ für die Bewer-

tungsstufe sensibel und $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ für die Bewertungsstufe resistent²³. Bakterienstämme mit einer MHK von $2 \mu\text{g/ml}$ werden als intermediär eingestuft. Von den 427 getesteten *Streptococcus pneumoniae* Isolaten hatten 6% (25 Isolate) einen Ciprofloxacin-MHK-Wert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ und waren daher als resistent einzustufen. Dieses Ergebnis liegt über den in den USA und Kanada gefundenen Werten von durchschnittlich um 1,5 % Ciprofloxacin-resistenten Isolaten^{14, 16}, allerdings unterhalb der hohen Anzahl der resistenten Isolate, die in Hong Kong im Jahre 2000 gefunden wurden. Dort zeigten 13,3 % der penicillinempfindlichen Isolate und 27,3 % der Penicillin-resistenten Bakterien für Levofloxacin einen MHK-Wert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ⁴⁴. Bei den Viridans-Streptokokken waren 20% der *Streptococcus mitis*-Isolate und 16 % der *Streptococcus sanguis*-Isolate als resistent einzustufen. Mit zunehmendem Gebrauch der Fluorchinolone ist mit einer Ausbreitung der Resistenzen aufgrund erhöhten Selektionsdrucks zu rechnen¹⁶.

Kreuzresistenz innerhalb einer Antibiotikaklasse ist kein seltenes Phänomen. Daher wurde untersucht, wie die neueren Fluorchinolone gegen die Ciprofloxacin-resistenten Isolate wirken. Deren Aktivität ist insgesamt als gut zu bewerten. Am besten wirkten Gemifloxacin und Clinafloxacin, wobei Gemifloxacin alle Isolate bei einer Konzentration von unter $1 \mu\text{g/ml}$ hemmte, und Clinafloxacin alle mit zwei Ausnahmen (MHK von $1 \mu\text{g/ml}$ bei den Stämmen 19 und 21). Es folgten Moxifloxacin und Gatifloxacin. Sparfloxacin wies vor Ciprofloxacin das zweitschlechteste Ergebnis auf. Die in dieser Untersuchung gefundene Reihenfolge der Aktivität stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein^{14, 24, 27, 54, 56, 66}.

Resistenz gegen Fluorchinolone erlangt ein Bakterium in erster Linie durch Punktmutationen in den Genen für DNS-Gyrase und Topoisomerase IV. Daher wurden die Sequenzen der „quinolone resistance-determining regions (QRDRs)“ von *gyrA* und *gyrB* sowie *parC* und *parE* untersucht. Es wurden Aminosäureaustausche an der Position 81 in *gyrA* (Serin zu Phenylalanin oder Tyrosin) sowie an den Positionen 79 und 83 in *parC* (Serin zu Phenylalanin oder Isoleucin bzw. Aspartat zu Asparagin) gefunden, und zwar in allen Fällen als Doppelmutationen. Der Austausch der polaren Aminosäure Serin (hydrophil) gegen Phenylalanin oder Isoleucin (hydrophob) kann Auswirkungen auf die Konformation im aktiven Zentrum des Enzyms haben, wodurch die Interaktion mit dem Chinolon behindert wird. Die detektierten Alterationen sind schon von mehreren Untersuchern beschrieben worden, und besonders wichtig ist, dass keine noch nicht beschriebenen Mutationen für die Resistenz der Pneumokokken und Viridans-Streptokokken verantwortlich gemacht werden können. Außerdem muss herausgestellt werden, dass die Mutationen unabhängig von ihrem geographischen Auftreten dieselben sind. Ferner ist bei den Viridans-Streptokokken der Aminosäureaustausch von Serin an Position 494 zu Threonin in *gyrB* und bei den

Pneumokokken Isoleucin an Position 460 zu Val in *parE* gefunden worden. Dieser wird jedoch kein wesentlicher Beitrag zur Resistenzentwicklung zugesprochen^{37, 54}.

Bei der Korrelation der minimalen Hemmkonzentrationen mit den Mutationen fällt auf, dass im Bereich von 4 µg/ml für Ciprofloxacin im Falle der Viridans-Streptokokken keine Mutation in *gyrA* oder *parC* zu finden ist; im Falle der Pneumokokken kommen jedoch bei gleicher MHK Isolate mit Doppelmutationen in *gyrA* und *parC* neben solchen ohne Änderung der Genloci vor. Durch zusätzliche Mutationen in *gyrB* und *parE* wird die Variabilität noch erhöht. Dies unterstützt die Hypothese von Millichap *et al.*⁶⁷, dass reduzierte Chinolonempfindlichkeit ein schlechter Voraussageparameter für das Muster der Mutationen ist. Nur die Levofloxacin-MHKs korrelieren mit den Mutationen, da die Isolate mit Aminosäureaustauschen diejenigen mit einer minimalen Hemmkonzentration von $\geq 4\mu\text{g/ml}$ waren. Bei der Untersuchung der minimalen Hemmkonzentrationen wird der Einfluss der Effluxmechanismen bei diesen Bakterienspezies deutlich, da alle Viridans-Streptokokken und 20 von 25 Pneumokokken zwischen einer und vier Verdünnungsstufen niedrigere MHK-Werte in Anwesenheit von Reserpin aufweisen. Auf diese Weise können die Bakterien in chinolonhaltiger Umgebung zumindest kurzfristig überleben und Mutationen erwerben, die dann die Chinolonresistenz bewirken bzw. noch weiter erhöhen. Allerdings fallen auch zwei Pneumokokken-Stämme (5 und 13) auf, die weder Mutationen noch eine Reserpinwirkung aufweisen, was möglicherweise auf bislang unbekannte Resistenzmechanismen bzw. Mutationen außerhalb der QRDRs hinweist, wie sie z. B. neulich von Janoir *et al.* im *parE*-Genlocus einer *in vitro* Mutante von *Streptococcus pneumoniae* entdeckt wurde⁵¹.

Des Weiteren wurde untersucht, ob es zwischen den einzelnen Substanzen Unterschiede im Ausmaß der Resistenzentwicklung gibt. Die Subkultivierung von Pneumokokken und A-Streptokokken in subinhibitorischen Chinolonkonzentrationen zeigte, dass alle untersuchten Vertreter dieser Stoffklasse das Potential zur Entwicklung von Resistenzen haben, wie es schon für die älteren Chinolone und andere Klassen von Chemotherapeutika beschrieben worden ist^{21, 22, 79}. Es bestehen jedoch bezüglich des Resistenzniveaus erhebliche Unterschiede in Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm. Insbesondere der Vergleich der neueren Antibiotika mit jenen der zweiten Generation (Ciprofloxacin und Sparfloxacin) ergibt keinen signifikanten Unterschied in der Selektion von Mutanten. Nur für Clinafloxacin, welches allerdings in der Zwischenzeit wegen Phototoxizität vom Markt genommen wurde⁵, ergibt sich eine über die zehn Tage tendenziell geringere Resistenzentwicklung. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von Pan *et al.*⁷⁶, die sowohl Gyrase als auch Topoisomerase IV als gleichbedeutende Ziele für Clinafloxacin erkannten. In diesem Fall sind Mutationen sowohl in *gyrA* als auch in *parC* nötig, um klinisch relevante

Resistenzen zu erzeugen. Um die Entwicklung von Resistenzen insgesamt zu verlangsamen, macht es daher Sinn, auch in Zukunft nach Stoffen zu forschen, die beide Topoisomerasen der Gruppe II als primäre Ziele haben. Ein neuerer Vertreter ist Trovafloxacin, das sehr gute Aktivität gegen *S. pneumoniae* und *S. aureus* zeigt. Neben der verbesserten Aktivität sowohl gegen Gyrase als auch gegen Topoisomerase spielt hierbei eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber dem Efflux eine Rolle^{38, 82}.

Einige ältere und neuere Untersuchungen sprechen den 8-Methoxychinolonen Moxifloxacin und Gatifloxacin günstige Eigenschaften bezüglich geringerer Resistenzentwicklung zu^{20, 26, 48, 62, 63}. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt in Widerspruch dazu keinen Unterschied in der Höhe der Resistenzen dieser Chinolonvertreter am Ende zehntägigen Passage im Vergleich mit Ciprofloxacin, Sparfloxacin und Gemifloxacin. Allenfalls bis zum vierten Tag ist eine geringfügig langsamere Resistenzentwicklung zu erkennen. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Versuchsstämmen müssen klären, ob die Methoxygruppe wirklich ein Hindernis in der Selektion von resistenten Bakterien darstellt. Diese Fragestellung ist aus zwei Gesichtspunkten von klinischem Interessen: Zum einen für den Fall, dass die subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen das Resultat einer unregelmäßigen Medikamenteneinnahme sind. Zum anderen bestehen Überlegungen, die Entwicklung von Resistenzen durch verkürzte Therapiedauer zu unterdrücken, besonders für Bakterien wie Pneumokokken, die auch gesunde Menschen besiedeln. Denn anders als bei pathogenen Keimen ohne Keimträgerstatus, bei welchen das Ziel der Antibiotikatherapie deren Eradikation ist, ist die komplette Abtötung von Keimen mit Trägerstatus wie *S. pneumoniae* nicht immer möglich. So soll eine Therapie mit verkürzter Dauer die klinischen Symptome bessern, während die Exposition des Individuums durch das Antibiotikum verringert wird⁸⁹. Es zeigte sich, dass durchschnittlich am Tag 5 für Clinafloxacin 50% des Resistenzniveaus vom 10. Tag, für Gemifloxacin 53%, für Gatifloxacin 54%, für Sparfloxacin 64%, für Moxifloxacin 65% und für Ciprofloxacin 80% erreicht waren. In absoluten Werten bedeutet dies, dass an Tag 5 zwei der sechs Stämme als resistent gegen Ciprofloxacin und einer gegen Gatifloxacin einzustufen sind. Eine Verkürzung der Therapiedauer kann also nicht in jedem Fall das Auftreten von Resistenzen verhindern.

Die zehntägige Subkultivierung auf chinolonfreiem Agar führte zu der wichtigen Erkenntnis, dass die Resistenzen auch ohne den selektiven Druck der Antibiotika stabil bleiben. Dies konnte schon bei *Staphylococcus aureus* gezeigt werden⁵³ und bestätigt Beobachtungen von Davies *et al.* bei *Streptococcus pneumoniae*²¹. Die minimalen Hemmkonzentrationen der Mutanten schwankten nach 10 Tagen ohne Chinolone nur um eine Verdünnungsstufe.

Alle in einem bestimmten Antibiotikum selektierten Mutanten zeigen auch gegenüber den anderen Wirkstoffen Kreuzresistenz. Es ist also davon auszugehen, dass die Mutationen die Aktivität aller Fluorchinolone in einem gewissen Ausmaß beeinflussen. Die Reihenfolge der Wirksamkeit entspricht der schon im ersten Teil dieser Untersuchung bei den klinischen Isolaten von Viridans-Streptokokken und Pneumokokken gefundenen, sprich Gemifloxacin > Clinafloxacin > Moxifloxacin > Gatifloxacin > Sparfloxacin > Ciprofloxacin. Trotz der guten Aktivität von Gemifloxacin und Clinafloxacin wirkten diese beiden Vertreter längst nicht gegen alle Mutanten. Bei einem Grenzwert von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ hemmten Clinafloxacin und Gemifloxacin nur 29 der 36 Mutanten.

Effluxaktivität spielt bei der Entstehung von Resistenzen eine große Rolle. In antibiotikahaltigem Milieu gewinnt das Bakterium Zeit, seine Resistenz durch Mutationen zu erhöhen, indem es den Wirkstoff aus der Zelle ausschleust. Das Ausmaß hängt einerseits von der chemischen Struktur des Chinolons ab. Ein großer Substituent an C-7 (Moxifloxacin) sowie Hydrophobizität und Größe des Substituenten an C-8 (Sparfloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin) reduzieren die Affinität der Effluxpumpen^{9, 93}. Daher unterliegen z.B. Ciprofloxacin und Levofloxacin dem Efflux in größerem Maße. Andererseits konnte diese Untersuchung eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm feststellen. Im Falle der Pneumokokken liegt bei Stamm 26 in Anwesenheit von Reserpin nur die Ciprofloxacin-MHK der Moxifloxacin-Mutante eine Verdünnungsstufe niedriger, bei den übrigen Stämmen zeigen sowohl der Wildtyp als auch sämtliche Mutanten hohen Ciprofloxacin-Efflux. Besonders Gemifloxacin selektiert für Bakterien mit hoher Effluxaktivität. Insgesamt kann für die große Mehrzahl der untersuchten Pneumokokken-Stämme von einer großen Bedeutung des Chinolon-Efflux für die Resistenz ausgegangen werden. Ein möglicher Ansatz zur Verminderung der Resistenzentwicklung besteht in der Kombination von Fluorchinolonen mit Effluxpumpen-Inhibitoren.

Dagegen zeigte Reserpin im Falle von *Streptococcus pyogenes* keinerlei Einfluss auf die minimalen Hemmkonzentrationen der Wildtypen oder der selektierten Mutanten. Die MHKs liegen in Anwesenheit von Reserpin um höchstens eine Verdünnungsstufe niedriger als ohne.

Die Sequenzierung der QRDRs von *gyrA* und *parC* der *in vitro* selektierten Mutanten förderte nur die klassischen Mutationen zu Tage, die aus diversen Untersuchungen und von den klinischen Isolaten aus dem ersten Teil dieser Arbeit hinlänglich bekannt sind. In einem Fall (*S. pneumoniae*-Stamm 29) wurde in *parC* der Aminosäureaustausch Lys137→Asn gefunden (nicht gezeigt), welcher von Munoz *et al.* beschrieben aber als nicht verantwortlich für Ciprofloxacinresistenz eingestuft

wurde ⁶⁸. Da diese Mutation sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten auftrat, kann diese Ansicht bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fluorchinolone gemäß den in dieser Untersuchung erhobenen Daten gegen die Mehrzahl der klinischen Isolate von Pneumokokken, A-Streptokokken und Viridans-Streptokokken eine ausreichende Wirksamkeit aufweisen. Insbesondere die neueren Vertreter wie Clinafloxacin und Gemifloxacin sind als potente antibakterielle Substanzen anzusehen. Jedoch sollte die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber den älteren Vertretern wie Ciprofloxacin Anlass zur Sorge sein. Es ist davon auszugehen, dass wie bei diesen auch bei gesteigertem Verbrauch der neuen Fluorchinolone Resistenzen auftreten werden. Dies ist umso mehr der Fall, als dass diese Untersuchung zeigen konnte, dass kein Vertreter ein signifikant geringeres Potential hat, resistente Stämme zu selektieren. Außerdem zeigte sich, dass die durch einen Wirkstoff entstandenen Mutanten auch ausgeprägte Kreuzresistenz gegenüber den jeweils anderen Wirkstoffen zeigten.

Ein Weg, die gute Wirksamkeit der Fluorchinolone bei der Bekämpfung der klinisch sehr bedeutsamen Pneumokokken- und Streptokokkeninfektionen zu bewahren, liegt sicherlich in der Weiterentwicklung der Substanzgruppe. Dabei scheinen sowohl die Herstellung von Strukturen, die sowohl Gyrase als auch Topoisomerase als Zielenzyme haben, als auch die mögliche Kombination mit Effluxhemmern viel versprechend zu sein. Allerdings ist die Weiterentwicklung der Pharmazeutika ein langwieriger und aufwendiger Prozess, der immer wieder durch Rückschläge gekennzeichnet ist, wenn Substanzen aufgrund starker Nebenwirkungen nicht eingesetzt werden können.

Daher ist es unverzichtbar, die Wirksamkeit der Fluorchinolone auch durch verantwortungsvollen und rationalen Gebrauch zu bewahren. Die Indikation zur Verabreichung von Antibiotika sollte im Allgemeinen immer sehr streng gestellt werden. Speziell die Fluorchinolone sollten nur dann Anwendung finden, wenn Resistenztestungen sicher gezeigt haben, dass die Standardtherapeutika keine ausreichende Wirksamkeit aufweisen. Jedoch sollten die Forderungen noch weitergehend formuliert werden: Im Sinne einer präventiv orientierten Medizin ist es oberstes Gebot, dass Infektionen von vornherein vermieden werden. Insofern ist die Umsetzung strenger Hygienemaßnahmen, insbesondere im stationären Bereich, unerlässlich. Nur durch die kombinierte Umsetzung der oben genannten Forderungen wird es möglich sein, die Wirksamkeit der antibakteriellen Substanzen im Ganzen und der Fluorchinolone im Speziellen zu erhalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Pneumokokken gelten als Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Viridans-Streptokokken und *Streptococcus pyogenes* gewinnen in letzter Zeit als Ursache von nosokomialen Bakteriämien bzw. schweren Weichteilinfektionen an Bedeutung. Anfänglich gute Erfolge in der Therapie mit Fluorchinolonen werden zunehmend durch Ausbildung von Resistenzen in Frage gestellt.

Die Zielstrukturen der Fluorchinolone sind zwei bakterielle Enzyme, die DNS-Gyrase und die Topoisomerase IV, die von den Genen *gyrA* und *gyrB* bzw. *parC* und *parE* kodiert werden. Resistente Bakterien besitzen eine veränderte Proteinstruktur der Enzyme in Folge von Punktmutationen in den genannten Genabschnitten. Außerdem sorgen Effluxsysteme für eine verminderte Konzentration der Chinolone in der Bakterienzelle.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, das Resistenzniveau klinischer Isolate aus verschiedenen europäischen Ländern zu erfassen. Weiterhin wurde die Entwicklung von Resistenzen *in vitro* über einen Zeitraum von zehn Tagen verfolgt und anschließend die zu Grunde liegenden Mutationen und Effluxaktivitäten untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten dabei sowohl Fluorchinolon-empfindliche Stämme von *S. pneumoniae* und *S. pyogenes* als auch resistente *S. pneumoniae*-Stämme.

Der Anteil der resistenten Stämme unter den klinischen Isolaten lag zwischen 6% (*S. pneumoniae*) und 16% bzw. 20% (*S. sanguis* bzw. *S. mitis*). Die zu Grunde liegenden Mutationen waren unabhängig vom geographischen Ursprung der Bakterien die gleichen. Besondere Erwähnung sollen die Aminosäureaustausche Ser81→Phe, Tyr in *gyrA* und Ser79→Phe sowie Asp83→Asn in *parC* finden.

Nach zehn Tagen Kultivierung in subinhibitorischen Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei unregelmäßiger Antibiotika-Einnahme entstehen können, führten alle getesteten Substanzen zu resistenten Stämmen. Keine Substanz zeigte ein geringeres Potential zur Resistenzentwicklung. Nur die 8-Methoxychinolone (Gatifloxacin und Moxifloxacin) zeigten zu Anfang einen tendenziell langsameren Anstieg der MHK, gegen Ende der zehn Tage war jedoch kein Unterschied mehr feststellbar. Höhe und Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung hingen stark vom jeweiligen Stamm ab. Alle Mutanten weisen ausgeprägte Kreuzresistenz gegenüber den jeweils anderen Fluorchinolonen auf.

Bei den *in vitro*-Mutanten wurden die schon bekannten Basenaustausche detektiert. Unterschiede gab es in der Effluxaktivität. Während Reserpin bei Pneumokokken einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die Effluxaktivität hatte, konnte bei *S. pyogenes* keine Veränderung der MHK-Werte nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um möglicherweise bislang unbekannte Gründe für die Entwicklung der Fluorchinolonresistenz zu entdecken.

Gez.: Prof. Dr. F.-J. Schmitz

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Acar, J. F., T.F. O'Brien, F.W. Goldstein, and R.N. Jones.** 1993. The epidemiology of bacterial resistance to quinolones. *Drugs* **45 (Suppl. 3)**:24-28
2. **Anderson, V. E., T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1998. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:17879-17885
3. **Appelbaum, P. C.** 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria; *pneumococci*. *Drugs* **51 (Suppl. 1)**:1-5
4. **Arvand, M., Hoeck. M., Hahn, H., and J. Wagner.** 2000. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates in Berlin. *J. Antimicrob. Chemother.* **46(4)**:621-624
5. **Ball, P.** 2001. Future of the quinolones. *Semin. Respir. Infect.* **16(3)**:215-224
6. **Bandak, S. I., Turnak, M. R., Allen, B. S., Bolzon, L. D., and D. A. Preston.** 2000. Oral antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* recently isolated in five countries. *Int. J. Clin. Pract.* **54(9)**:585-588
7. **Baranova, N. N. and A. A. Neyfakh.** 1997. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1396-1398
8. **Bast, D.J., J. C. de Azavedo, T. Y. Tam, L. Kilburn, C. Duncan, L A. Mandell, R. J. Davidson, and D. E. Low.** 2001. Interspecies recombination contributes minimally to fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(9)**:2631-2634
9. **Beyer, R., E. Pestova, J. J. Millichap, V. Stosor, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 2000. A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:798

10. **Blondeau, J.M. and G.S. Tillotson.** 2000. Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory pathogens – a global perspective. *Semin. Respir. Infect.* **15(3)**:195-207

11. **Brandis, H., W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer.** 1994. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, **7. Auflage**: 371-375

12. **Brenwald, N. P., M. J. Gell, and R. Wise.** 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2032-2035

13. **Broll, R., Eckmann, C., Kujath, P. and H. P. Bruch.** 1998. "Streptococcal toxic shock-like syndrome." *Chirurg* **69(8)**:806-12

14. **Brueggemann, A. B., S. L. Coffman, P. Rhomberg, H. Huynh, L. Almer, A. Nilius, R. Famm, and G. V. Doern.** 2002. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States since 1994-1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(3)**:680-688

15. **Canton, R., Loza, E., Morosini, M. I., and F. Baquero.** 2002. Antimicrobial resistance amongst isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* **50 (Suppl. S1)**:9-24

16. **Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low.** 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Canadian Bacterial Surveillance Network. *N. Engl. J. Med.* **341**:233-239

17. **Critchley, I. A., Sahm, D. F., Thornsberry, C., Blosser-Middleton, R. S., Jones, M. E., and J. A. Karlowsky.** 2002. Antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* isolated from respiratory and skin and soft tissue infections: United States LIBRA surveillance data from 1999. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42(2)**:129-135

18. **Cormican, M. G. and R. N. Jones.** 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in grampositive bacteria; *enterococci*, *staphylococci* and *nonpneumococcal streptococci*. *Drugs* **51 (Suppl. 1)**:6-12

19. **Cunningham, M. W.** 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin. Microbiol. Rev. **13(3)**:470-511

20. **Dahlhoff, A.** 2000. Dissociated resistance among fluoroquinolones. Presented at the 1st international symposium on resistant grampositive infections, San Antonio, Texas

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

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

23. **Deutsches Institut für Normung, Normenausschuss Medizin (NAMed).** Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Teil 4: Bewertungsstufender minimalen Hemmkonzentration – MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. Beiblatt 1 zu DIN 58940-4, Januar 2000

24. **Davies, T. A., L. M. Kelly, G. A. Pankuch, K. L. Credito, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 2000. Antipneumococcal activities of gemifloxacin compared to those of nine other agents. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:304-310

25. **Domagala, J. M.** 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. J. Antimicrob. Chemother. **33**:685-706

26. **Dong, Y., Xu, C., Zhao, X., Domagala, J., and K. Drlica.** 1998. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **42(11)**:2978-2984

27. **Dorn, G. V., K. P. Heilmann, H. K. Huynh, P. R. Rhomberg, S. L. Coffman, and A. B. Brueggemann.** 2001. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during

- 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(6)**:1721-1729
28. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA-Gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **61**:377-392
29. **Efstratiou, A.** 2000. Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother.* **45 Suppl**:3-12
30. **El Amin, N., S. Jalal, and B. Wretling.** 1999. Alterations in *gyrA* and *parC* associate with fluoroquinolone resistance in *E. faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:947-949
31. **Ferrandiz, M. J., J. Oteo, B. Aracil, J. L. Gomez-Garces, and A. G. de la Campa.** 1999. Drug efflux and *parC* mutations are involved in fluoroquinolone resistance in viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2520-3
32. **Ferrero L., C. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *glaA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**:1554-1558
33. **Forward, K.R.** 1999. The epidemiology of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Semin. Respir. Infect.* **14(3)**:243-254
34. **Fukuda, H. and K. Hiramatsu.** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:410-412
35. **Gellert, M., M. H. O'Dea, K. Mizuuchi, and H. Nash.** 1976. DNA-Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**:3872-3876
36. **Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise.** 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:187-189
37. **Gonzalez, I., M. Georgiou, F. Alcaide, D. Balas, J. Linares, and A. De La Campa.** 1998. Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2792-2798

38. **Gootz T.-D., R. Zaniewski, S.-L. Haskell, F.-S. Kaczmarek, and A.-E. Maurice.** 1999. Activities of trovafloxacin compared with those of other fluoroquinolones against purified topoisomerases and *gyrA* and *griA* mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1845-1855
39. **Gootz, T. D., R. Zaniewski, S. Haskell, B. Schmieder, J. Tankovic, D. Girard, P. Courvalin, and R. J. Polzer.** 1996. Activity of the new fluoroquinolone trovafloxacin (CP-99,219) against DNS-Gyrase and topoisomerase IV mutants of *Streptococcus pneumoniae* selected n vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2691-2697
40. **Gordon, K. A., Beach, M. L., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., Rhomberg, P. R., and A. H. Mutnick.** 2002. Antimicrobial susceptibility patterns of beta-haemolytic and viridans group streptococci: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43(2)**:157-162
41. **Hahn, H., D. Falke, P. Klein.** 1994. *Medizinische Mikrobiologie.* Springer-Verlag, **2. Auflage**:275-284
42. **Heisig, P.** 1997. Fluorchinolonecarbonsäuren. Moderne antibakterielle Chemotherapeutika mit breitem Wirkungsspektrum. *Arzneimitteltherapie* **1**:14-23
43. **Heisig, P.** 1994. Mechanismen bakterieller Resistenz gegenüber Antibiotika. *Arzneimitteltherapie* **12**:203-218
44. **Ho, P. L., R. W. Yung, D. N. Tsang, T. L. Que, M. Ho, W. H. Seto, T. K. Ng, W. C. Yam, and W. W. Ng.** 2001. Increasing resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones: results of a Hong Kong multicentre study in 2000. *J. Antimicrob. Chemother.* **48(5)**:659-665
45. **Hooper, D. C.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates* **2**:38-55
46. **Hooper, D. C.** 1993. Quinolone mode of action – new aspects. *Drugs* **45 (Suppl. 3)**:8-14

47. **Horowitz, D. S. and J. C. Wang.** 1987. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA-Gyrase. *J. Biol. Chem.* **262**:5339-5344
48. **Hosaka, M, T. Yasue, H. Fukuda, H. Tomizawa, H. Aoyama, and K. Hirai.** 1992. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy Quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2108-2117
49. **Janoir, C., I. Podglajen, M. D. Kitzis, C. Poyart, and L. Gutmann.** 1999. *In vitro* exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *Streptococcus mitis*. *J. Infect. Dis.* **180**:555-558
50. **Janoir, C, V. Zeller, M. D. Kitzis, N. J. Moreau, and L. Gutmann.** 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**:2760-2764
51. **Janoir, C., Varon, E., Kitzis, M. D., and L. Gutmann.** 2001. New mutation in *parE* in a pneumococcal *in vitro* mutant resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **45(3)**:952-955
52. **Jedrzejak, M.J.** 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(2)**:187-207
53. **Jones, M. E., N.-M. Boenink, J. Verhoef, K. Köhrer, and F.-J. Schmitz.** 2000. Multiple mutations conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate long-term stability in an antibiotic-free environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:353-356
54. **Jones, M. E., D. F. Sahn, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Köhrer, and F.-J. Schmitz.** 2000. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different quinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:462-466
55. **Jones, R.N. and W.R. Wilson.** 1998. Epidemiology, laboratory detection, and therapy of penicillin-resistant streptococcal infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **31(3)**:453-459

56. **Jorgensen, J. H., L. M. Weigel, M. J. Ferraro, J. M. Swenson, and F. C.Tenover.** 1999. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:329-334
57. **Kaatz G.-W., S.-M. Seo, and C.-A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37**:1086-1094
58. **Kaatz G.-W., S.-M. Seo, and C.-A. Ruble.** 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2650-2655
59. **Kanematsu, E., T. Deguchi, M. Yasude, T. Kawamura, Y. Nishino, and Y. Kawada.** 1998. Alterations in the *gyrA* subunit of DNS-Gyrase and the *parC* subunit of DNS topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *E. faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:433-435
60. **Kato, J.-I., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**:393-404
61. **Leshner, G. Y., E. D. Froelich, and M. D. Gruet.** 1962. 1,8 naphthyridine derivatives: A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharmacol. Chem.* **5**:1063-1068
62. **Lu, T., Zhao, X., and K. Drlica.** 1999. Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(12)**:2969-2974
63. **Lu, T., Zhao, X., Li, X., Drlica-Wagner, A., Wang, J. Y., Domagala, J., and K. Drlica.** 2001. Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(10)**:2703-2709
64. **Markham P.-N. and A.-A. Neyfakh.** 1996. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2673-2674

65. **Markham, P. N.** 1999. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:988-989
66. **Milatovic, D., F.-J. Schmitz, S. Brisse, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2000. *In vitro* activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1102-1107
67. **Millichap, J. J., E. Pestova, F. Siddiqui, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 2001. Fluoroquinolone resistance is a poor surrogate marker for type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **39**(7):2719-2721
68. **Munoz, R. and A. G. de la Campa.** 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA-Gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**:2252-2257
69. **Munoz-Bellido J.-L., M. Alonzo Manzanares, J.-A. Martinez Andres, M.-N. Gutierrez Zufiaurre, G. Yague Guirao, M. Segovia Hernandez, and J.-A. Garcia-Rodriguez.** 1999. Efflux-pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild-type *gyrA*, *gyrB*, *grrA* and *norA*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**:354-356
70. **Naber, K., D. Adam, et al.** 1998. Einteilung der Fluorchinolone. *Münch. Med. Wschr.* **140**:248-250
71. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
72. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1998. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighth informational supplement. NCCLS document M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

73. **Neyfakh A.-A.** 1997 Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* **5**:309-313
74. **Pan, X. S. and L. M. Fisher.** 1996. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNS topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J. Bacteriol.* **178**:4060-4069
75. **Pan, X.-S. and L. M. Fisher.** 1997. Targeting of DNS-Gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:471-474
76. **Pan, X.-S. and L. M. Fisher.** 1998. DNS-Gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2810-2816
77. **Pan, X.-S. and L. M. Fisher.** 1999. DNS-Gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1129-1136
78. **Pan, X.-S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNS-Gyrase as ciprofloxacin targets in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2321-2326
79. **Pankuch, G. A., S. A. Juenmann, T. A. Davies, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 1998. *In vitro* selection of resistance to four β -lactams and azithromycin in *Streptococcus pneumoniae*: *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2914-2918
80. **Peng, H. and K. Marians.** 1993. Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and *pBR322* DNS replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8571-8575
81. **Perichon, B., J. Tankovic, and P. Courvalin.** 1997. Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:166-1167
82. **Pestova, E., R. Beyer, N. P. Cianciotto, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 1999. Contribution of topoisomerase IV and DNS-Gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2000-2004

83. **Pfaller, M.A., R.N. Jones, G.V. Doern, K. Kugler and the SENTRY Participants Group.** 1998. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1762-1770
84. **Pfaller, M.A., R.N. Jones, S.A. Marshall, M.B. Edmond, and R.P. Wenzel.** 1997. Nosocomial streptococcal blood stream infections in the SCOPE Program: species occurrence and antimicrobial resistance. The SCOPE Hospital Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **29(3)**:259-263
85. **Reece, R. J. and A. Maxwell.** 1991. DNS-Gyrase: Structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **26(3/4)**:335-375
86. **Schmitz F.-J., J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 1999. Comparative activities of six different fluoroquinolones against 9,682 clinical bacterial isolates from 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12(4)**:311-317
87. **Schmitz F.-J., A.-C. Fluit, S. Brisse, J. Verhoef, K. Köhrer, and D. Milatovic.** 1999. Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative *in vitro* activities of new quinolones against European *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**:281-287
88. **Schmitz F.-J., M.-E. Jones, B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Luckefahr, A. Fluit, U. Hadding, H.-P. Heinz, and K. Köhrer.** 1998. Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on Ciprofloxacin MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1249-1252
89. **Schrag, S. J., B. Beall, and S. F. Dowell.** 2000. Limiting the spread of resistant pneumococci: Biological evidence for the effectiveness of alternative interventions. *Clinical Microbiology Reviews.* **13(4)**:588-601
90. **Shen, L. L. and D. T. W. Chu.** 1996. Type II topoisomerases as antibacterial targets. *Cur. Pharm. Design.* **2**:195-208

91. **Shenep, J.L.** 2000. Viridans-group streptococcal infections in immunocompromised hosts. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **14(2)**:129-135
92. **Soto, A., P.H. McWhinney, C.C. Kibbler, and J. Cohen.** 1998. Cytokine release and mitogenic activity in the viridans streptococcal shock syndrome. *Cytokine.* **10(5)**:370-376
93. **Takenouchi T., F. Tabata, Y. Iwata, H. Hanzawa, M. Sugawara, and S.Ohya.** 1996. Hydrophobicity is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1835-1842
94. **Varon, E.** 2001. Severe pneumococcal infections: virulence aspects. *Arch. Pediatr. Suppl* **4**:752-756
95. **Varon, E. and L. Gutmann.** 2000. Mechanisms and spread of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **151(6)**:471-473
96. **Varon, E., C. Janoir, M.-D. Kitzis, and L. Gutmann.** 1999. *ParC* and *gyrA* may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *S. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:302-306
97. **Wakabayashi, E. and S. Mitsuhashi.** 1994. *In vitro* antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:594-601
98. **Whitney, C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, C. Lexau, A. Reingold L. Lefkowitz, P. R. Cieslak, M. Cetron, E. R. Zell, J. H. Jorgensen, and A. Schuchat; Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network.** 2000. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N. Engl. J. Med.* **343(26)**:1917-1924
99. **Willmott, C. J. R. and A. Maxwell.** 1993. A single point mutation in the DNS-Gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNS complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:126-127
100. **Yan, S. S., Fox, M. L., Holland, S. M., Stock, F., Gill V. J., and D. P. Fedorko.** 2000. 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.* **44(11)**:3196-3198

101. **Yoshida, H., M Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, and M. Konno.** 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* **172**:6942-6949
102. **Zechiedrich, E. L. and N. R. Cozzarelli.** 1995. Roles of topoisomerase IV and DNS-Gyrase in DNS unlinking during replication of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**:2859-2869
103. **Zeller, V., C. Janoir, M. D. Kitzis, L. Gutmann, and N. J. Moreau.** 1997. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:471-474

7. ANHANG

7.1 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der Fluorchinolone nach Gruppen	10
Tabelle 2: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
Tabelle 3: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von <i>Streptococcus mitis</i>	36
Tabelle 4: MHK-Werte und Mutationen der klinischen Isolate von <i>Streptococcus sanguis</i> ...	37
Tabelle 5: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	41
Tabelle 6: Ergebnisse des Reserpintests der selektierten Mutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	43
Tabelle 7: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von <i>Streptococcus pyogenes</i>	48
Tabelle 8: Ergebnisse des Reserpintest der <i>Streptococcus pyogenes</i> -Mutanten	49
Tabelle 9: MHK-Werte und Mutationen der selektierten Mutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	53
Tabelle 10: Ergebnisse des Reserpintests der selektierten Mutanten von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	54

7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel der Nalidixinsäure	9
Abbildung 2: Strukturformel der 4-Chinolinsäure	9
Abbildung 3: Strukturformel von Ciprofloxacin.....	10
Abbildung 4: Strukturformel von Levofloxacin.....	11
Abbildung 5: Strukturformel von Sparfloxacin	11
Abbildung 6: Strukturformel von Gatifloxacin.....	11
Abbildung 7: Strukturformel von Moxifloxacin	11
Abbildung 8: Strukturformel von Clinafloxacin	11
Abbildung 9: Strukturformel von Gemifloxacin.....	11
Abbildung 10: Funktion der DNS-Gyrase (modifiziert nach Heisig ⁴²)	12
Abbildung 11: Strukturformel von Reserpin.....	15
Abbildung 12: Mutantenselektion.....	25
Abbildung 13: Gelelektrophorese der PCR-Produkte des <i>gyrA</i> -Genabschnitts (obere Reihe) und des <i>parC</i> -Genabschnitts (untere Reihe) von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
Abbildung 14: Gelelektrophorese der aufgereinigten <i>gyrA</i> -Genabschnitte (obere Reihe) und <i>parC</i> -Genabschnitte (untere Reihe) von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
Abbildung 15: Ergebnis einer Sequenzanalyse am Beispiel des <i>parC</i> -Genfragments von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	34
Abbildung 16: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 26	37
Abbildung 17: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 27	38
Abbildung 18: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 28	38
Abbildung 19: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 29	39
Abbildung 20: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 30	39
Abbildung 21: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 31	40

Abbildung 22: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm 1	44
Abbildung 23: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm 2.....	45
Abbildung 24: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm3.....	45
Abbildung 25: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm 4.....	46
Abbildung 26: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm 5.....	46
Abbildung 27: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pyogenes</i> Stamm 6.....	47
Abbildung 28: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 32	51
Abbildung 29: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 33	51
Abbildung 30: Resistenzentwicklung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm 34	52

7.3 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei

Herrn Prof. Dr. med. Hadding und Herrn Prof. Dr. med. Heinz, die mir Arbeitsmaterial und Geräte zur Verfügung stellten

der Arbeitsgruppe Schmitz, namentlich Mechthild Boos und Susanne Mayer, für die gute Zusammenarbeit und die vielen Tipps und Ratschläge, die mir die bei der Arbeit im Labor sehr halfen

der Forschungsgruppe des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ), namentlich Herrn Dr. rer. nat. Köhler und Frau Sybille Scheuring

den medizinisch-technischen Assistentinnen und insbesondere dem Team der „Nährbodenküche“

bei Herrn Prof. Dr. med. F.-J. Schmitz für die Überlassung des Themas, für seine freundliche und humorvolle Betreuung und die gute Zusammenarbeit

und ganz besonders bei meinen Eltern, die den Fortgang der Arbeit mit Interesse verfolgten und mich dabei immer unterstützten. Ohne sie wäre weder die Promotion noch das Zahnmedizinstudium möglich gewesen.

7.4 LEBENSLAUF

ZUR PERSON

Name: Ansgar Christian Alexander Fischer
 Anschrift: Am alten Kirmesplatz 13, 58453 Witten
 geboren am: 27. Januar 1975 in Düsseldorf
 Familienstand: ledig
 Eltern: Ursula Fischer-Gebhardt, Lehrerin
 Prof. Dr. Peter Fischer, Vorsitzender Richter am
 Bundesfinanzhof

SCHULBILDUNG

09/1981 – 06/1985 Grundschule Erich-Müller-Straße, Düsseldorf-Benrath
 08/1985 – 06/1994 Schlossgymnasium Düsseldorf-Benrath
 09/1991 – 06/1992 „Westtown School,“ Westtown, Pennsylvania (USA)

ZIVILDIENTST

07/1994 – 09/1995 Kindertagesklinik für Psychosomatik des Evangelischen
 Krankenhauses, Düsseldorf

HOCHSCHULBILDUNG

10/1995 – 09/1996 Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität
 Düsseldorf
 10/1996 – 03/2000 Studium der Zahnheilkunde in Düsseldorf
 04/2000 – 12/2001 Studium der Zahnheilkunde an der Medizinischen Fakultät
 „Carl Gustav Carus“ der TU Dresden

Abschluss mit dem Staatsexamen am 8.12.2001

BERUFSTÄTIGKEIT

06/2002 – 06/2003 Assistenz Zahnarzt in der Praxisgemeinschaft
 Dr. Hoffmann, Dr. Maierhofer, Einhoff und Kollegen
 Graf-Adolf-Str. 24, 40212 Düsseldorf

seit 08/2003 Weiterbildungsassistent für Kieferorthopädie an der
 Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der
 Universität Witten/Herdecke

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 03/2001 Boos M, Mayer S, **Fischer A**, Kohrer K, Scheuring S, Heisig P, Verhoef J, Fluit AC, Schmitz FJ.
In vitro development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*.
Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar; 45(3):938-42.
- 03/2001 Schmitz FJ, **Fischer A**, Boos M, Mayer S, Milatovic D, Fluit AC.
Quinolone-resistance mechanisms and in vitro susceptibility patterns of European isolates of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* , and *Streptococcus pneumoniae*.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001 Mar; 20(3):219-22.