A close-up photograph of a petri dish containing a red agar medium. The dish is tilted, showing a white bacterial culture streaked across the surface. The background is a light, neutral color.

**IN-VITRO WIRKSAMKEIT VON MOXIFLOXACIN
UND LINEZOLID GEGEN STAPHYLOCOCCUS
AUREUS-, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE-
UND ENTEROCOCCUS SPP.-ISOLATE IN
ABHÄNGIGKEIT VOM TESTMEDIUM
UND DER KEIMLOKALISATION**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

CORNELIA WILHELM

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. med. P.M. Shah

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
in Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

***In-vitro* Wirksamkeit von Moxifloxacin und
Linezolid gegen *Staphylococcus aureus*-,
Streptococcus pneumoniae- und *Enterococcus* spp.-Isolate
in Abhängigkeit vom Testmedium und
der Keimlokalisierung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
CORNELIA WILHELM
Tierärztin aus Maintal

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. M. Shah

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2004

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Pramod M. Shah danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Seine stete Gesprächsbereitschaft und Motivation trugen zu einem vorbildlichen Klima bei der Durchführung der Versuche und der Herstellung des Manuskriptes bei.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer möchte ich mich für die Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin bedanken.

Ein besonderer Dank richtet sich an die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Institutes für Veterinär-Physiologie für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Den Medizinisch Technischen Assistentinnen des „Infektionslabors“ danke ich für die freundlichen Ratschläge und die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Versuche.

Dr. med. vet. Kock sei Dank für die Hilfe bei der Blutentnahme von Schafen der Tierversuchsanstalt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. THEMENBEZOGENE LITERATURÜBERSICHT	4
2.1. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN	4
2.2. MOXIFLOXACIN	5
2.3. LINEZOLID	6
2.4. VORKOMMEN UND KLINISCHE BEDEUTUNG DER IN DIESER STUDIE BETRACHTETEN BAKTERIENSPEZIES UND –STÄMME, SOWIE DEREN EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER MOXIFLOXACIN UND LINEZOLID	8
2.5. ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVITÄT ANTIMIKROBIELLER WIRKSTOFFE VON DER ZUSAMMENSETZUNG DES TESTMEDIUMS	11
2.6. AKTIVITÄT ANTIMIKROBIELLER SUBSTANZEN GEGEN INTRA-ZELLULÄRE BAKTERIELLE KRANKHEITSERREGER	13
2.7. THEMENSTELLUNG	18
3. MATERIAL	19
3.1. BAKTERIENSTÄMME	19
3.1.1. PNEUMOKOKKEN	19
3.1.2. STAPHYLOKOKKEN	20
3.1.3. ENTEROKOKKEN	20
3.2. NÄHRMEDIEN	21
3.2.1. BLUT	21
3.2.2. SERUM	21
3.2.3. SONSTIGE MATERIALIEN	21
3.3. ANTIBIOTIKA	22
3.3.1. CEFUROXIM	22
3.3.2. LINEZOLID	23
3.3.3. MOXIFLOXACIN	24
3.3.4. OXACILLIN	25
3.3.5. PENICILLIN G, BENZYL PENICILLIN (<i>Grünethal</i>)	26
3.3.6. VANCOMYCIN (<i>Lilly Pharma</i>)	27
4. METHODEN	28
4.1. BESTIMMUNG DER MINIMALEN HEMMKONZENTRATION UND DER MINIMALEN BAKTERIZIDEN KONZENTRATION	28
4.1.1. HERSTELLUNG DER VERDÜNNUNG DER PRÜFSUBSTANZEN	28
4.1.2. HERSTELLUNG DES INOKULUMS	29
4.1.3. INOKULATION	29
4.1.4. AUSWERTUNG	29
4.1.5. MHK-BESTIMMUNG FÜR VANCOMYCIN	30
4.1.6. WIRKSAMKEITSGRENZWERTE	30
4.2. BESTIMMUNG DER BAKTERIZIDIE-KINETIK	31
4.2.1. PRINZIP	31
4.2.2. WIRKSTOFFVERDÜNNUNG	32
4.2.3. HERSTELLUNG DES INOKULUMS	32
4.2.4. TESTDURCHFÜHRUNG	32
4.2.5. AUSWERTUNG	33
4.3. DURCHFÜHRUNG DER PHAGOZYTOSE-VERSUCHE	34
4.3.1. KURZER RÜCKBLICK AUF DIE METHODENENTWICKLUNG	34
4.3.2. ISOLIERUNG DER GRANULOZYTEN	35
4.3.3. BESTIMMUNG DER GRANULOZYTENZAHL	35
4.3.4. HERSTELLUNG DER BAKTERIENKULTUR	36
4.3.5. OPSONISIERUNG	36
4.3.6. PHAGOZYTOSE	36
4.3.7. ISOLIERUNG DER GRANULOZYTEN NACH AUFNAHME VON BAKTERIEN	36

4.3.8. ZUGABE DES ANTIINFEKTIVUMS	37
4.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	37
5. ERGEBNISSE	39
5.1. MHK UND MBK	39
5.1.1. PNEUMOKOKKEN	39
5.1.2. STAPHYLOKOKKEN	40
5.1.3. ENTEROKOKKEN	41
5.2.1. PENICILLIN G	42
5.2.1.1. Penicillin-sensible <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
5.2.1.2. Penicillin-resistente <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
5.2.2. MOXIFLOXACIN	49
5.2.4.1. Penicillin-sensible <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
5.2.4.2. Penicillin-resistente <i>Streptococcus pneumoniae</i>	51
5.2.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	57
5.2.4.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	63
5.2.4.5. <i>Enterococcus faecium</i>	65
5.2.3. LINEZOLID	69
5.2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	69
5.2.4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	75
5.2.4.3. <i>Enterococcus faecium</i>	77
5.2.4. OXACILLIN	80
5.2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	80
5.2.5. CEFUROXIM	85
5.2.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	85
5.3. PHAGOZYTOSE	89
5.3.1. EINFÜHRUNG	89
5.3.2. MOXIFLOXACIN	90
5.3.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	90
5.3.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	93
5.3.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	96
5.3.2.4. <i>Enterococcus faecium</i>	98
5.3.3. LINEZOLID	100
5.3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	100
5.3.3.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	103
5.3.3.3. <i>Enterococcus faecium</i>	105
5.4. TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	106
6. DISKUSSION	110
6.1. BAKTERIZIDIE-KINETIK IN ABHÄNGIGKEIT DES NÄHRMEDIUMS	112
6.2. INTRAZELLULÄRE AKTIVITÄT	114
7. ZUSAMMENFASSUNG	118
8. SUMMARY	119
9. LITERATURVERZEICHNIS	120
10. ANHANG	133

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
aqua dest.	aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CXM	Cefuroxim
DIN	Deutsche Industrienorm
d.h.	das heißt
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
h	hora (Stunde)
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KBE	koloniebildende Einheit
LZD	Linezolid
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmkonzentration
MHK ₅₀	MHK, bei der 50 % der KBE abgetötet werden
MHK ₉₀	MHK, bei der 90 % der KBE abgetötet werden
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MXF	Moxifloxacin
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
n.e.	nicht erreicht
OXA	Oxacillin
PEN	Penicillin G
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
spp.	Spezies
usw.	und so weiter
VAN	Vancomycin
w.g.	wieder gewachsen
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1928 entdeckt der englische Biologe Sir Alexander Fleming (1881-1955) durch eine zufällige Beobachtung die antibiotische Wirkung des Penicillins. Er ahnt damals noch nicht, von welcher bahnbrechenden Bedeutung diese Entdeckung ist. 1945 erhält er dafür den Nobelpreis.

Seit dieser Zeit sind große Fortschritte in der antiinfektiösen Therapie erzielt worden. Es wurden zahlreiche chemisch unterschiedliche Antibiotika entwickelt. Zu den bedeutendsten Klassen zählen beispielsweise die in der β -Lactam-Gruppe zusammengefassten Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame oder auch die Gyrase-Hemmer, Glycopeptide, Oxazolidinone und andere. Die verschiedenen Klassen zeichnen sich durch Unterschiede in ihren Wirkungsmechanismen und -spektren aus. Sie haben nunmehr seit Jahrzehnten ihre feste Stellung in der Medizin. Heute kommen Antibiotika in fast allen Bereichen der Medizin und Tiermedizin zum Einsatz und tragen zur Eindämmung vieler Infektionskrankheiten bei.

Die Entwicklung neuer Antibiotika wird mit nur geringer zeitlicher Verzögerung von dem Auftreten wirkstoffresistenter Bakterienstämme begleitet, deren klinische Bedeutsamkeit mit dem vermehrten Auftreten von Multiresistenzen dramatisch ansteigt, und vor allem Klinikärzte immer wieder vor ernsten therapeutischen Problemen stellt [Doern 30, Hakenbeck 43, Hiramatsu 50, Huppertz 54, Hsueh 53, Kolbert 67, Kresken 69-72, Krueger 73, Reacher 95, Reinert 97-99, Uttley 117]. In dieser Arbeit betrachtete paradigmatische Beispiele für Resistenzentwicklung unter Krankheitserregern sind die gram-positiven Bakterien *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sowie die Enterokokken-Spezies *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium* (*E. faecium*).

Der hohe Selektionsdruck und die daraus folgende schnelle Resistenzentwicklung ist zumindest teilweise durch den steigenden und oft unnötigen Einsatz der Wirkstoffe zu erklären. Im Jahr 1998 bekam nahezu jeder zweite Bundesbürger mindestens einmal ein Antibiotikum verschrieben. Die Indikation dieser Therapie ist durchaus fragwürdig und mitunter durch die Unsicherheit vieler Ärzte begründet, die sich in Zweifelsfällen meist sehr schnell für eine Antibiotikatherapie entscheiden [Höffler 52]. Hinzu kommt die Erwartungshaltung der Patienten, die eine rasche Besserung wünschen. In der Tiermedizin, besonders im Bereich der Nutztierhaltung, tritt zusätzlich noch der finanzielle Aspekt hinzu. Um Laborkosten zu sparen werden Kombinationspräparate bestehend aus verschiedenen Wirkstoffen angewandt, um möglichst rasch und kostengünstig alle eventuell vorhandenen pathogenen Keime abzutöten.

Die zunehmend bedrohliche Resistenzsituation erfordert die schnelle Identifizierung neuer Wirkstoffe, um einen Rückfall in die Präantibiotika-Ära abzuwenden. Besondere Bedeutung kommt daher der Neuentwicklung innovativer Antiinfektiva mit neuen Wirkmechanismen zur Bekämpfung multiresistenter bakterieller Krankheitserreger zu. Bei der Erforschung neuer Antiinfektiva wird die Aktivitätsbestimmung gegenüber den Zielerregern meist in standardisierten Nährmedien auf Peptonbasis durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der chemisch-biochemischen Einflüsse auf die relative Wirksamkeit zu gewährleisten. Zahlreiche Berichte über die Abhängigkeit der Antibiotika-Wirksamkeit von der Zusammensetzung des Nährmediums [Andrews 5, Helm 45-46, King 62, Nagl 85, Shah 107-109], die sowohl geringere [Helm 45-46] als auch höhere [Shah 108-109] antibakterielle Aktivität zur Folge haben kann, belegen die Notwendigkeit dieses Vorgehens. Der Hauptwirkort von Antibiotika in menschlichen und tierischen Organen und Geweben ist in vielen Fällen der flüssigkeitsgefüllte Extrazellularraum, der beispielsweise Blutplasma, Lymphe, Liquor, Galle oder Urin entsprechen kann.

Deren chemische und biochemische Eigenschaften unterscheiden sich gravierend von den standardisierten *in-vitro* Testbedingungen. Daher ist eine spezifische Testung von Wirkstoffen auf antibakterielle Wirksamkeit in mehr *in-vivo*-nahen Untersuchungssystemen geboten, um Behandlungserfolge und –misserfolge in Modelltierstudien und letztlich auch bei Patienten besser bewerten zu können.

Man weiß heute, dass bei Infektionskrankheiten nicht nur extrazelluläre Erreger von Bedeutung sind, sondern viele Bakterien obligat oder fakultativ intrazellulär in Mammalier-Zellen vorkommen. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene Salmonellen- und Mykobakterien-Spezies, *Listeria monocytogenes*, aber auch der ubiquitär vorkommende *S. aureus*. Diese Bakterien sind in der Lage nach Aufnahme durch oder aktives Eindringen in die Wirtszelle nicht nur in dieser zu überleben, sondern sich auch dort zu vermehren. Zielt der Einsatz von Antiinfektiva auf die Behandlung dieser intrazellulären bakteriellen Krankheitserreger ab, so ist der prädiktive Wert von „Bouillon“-Studien noch geringer.

Viele Antibiotika werden nicht oder nur in ungenügender Menge von infizierten Mammalierzellen aufgenommen, so dass auch in „Bouillon“-Studien sensitive Keime schwer beherrschende Infektionskrankheiten verursachen können. Selbst der Nachweis einer Aufnahme oder sogar der Akkumulation eines Wirkstoffs in Wirtszellen ist keine Garantie für seine therapeutische Aktivität, da beispielsweise Sequestrierung in irrelevanten Zellkompartimenten, pH-Abhängigkeit der bakteriziden oder bakteriostatischen Potenz oder auch ein möglicherweise veränderter physiologischer Zustand des bakteriellen Krankheitserregers die Wirksamkeit eines Antibiotikums einschränken oder unterbinden kann. Daher ist zur Behandlung solcher Infektionskrankheiten der experimentelle Nachweis der intrazellulären Wirksamkeit verschiedener Bakterien-, Wirtszell- und Antibiotika-Kombinationen von entscheidender Bedeutung [Al-Nawas 1-3, Broeck 14, Carryn 19, Hof 51, Mandell 80, Maurin 83, Pascual 90-91, Schwab 104, Seral 105, Tulkens 115-116].

2. THEMENBEZOGENE LITERATURÜBERSICHT

2.1. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Die Art der Wirkung von Antibiotika besteht entweder in einem keimabtötenden Effekt (Bakterizidie) oder in einer Hemmung der Keimvermehrung (Bakteriostase). Die Bakerizidie ist gemäß NCCLS M26-A [NCCLS 87] definiert als eine Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) um mindestens 3 \log_{10} -Stufen, also um mindestens 99,9 %. Die Aktivität eines Antibiotikums kann sowohl konzentrationsabhängig als auch zeitabhängig sein. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums definiert, die unter standardisierten Bedingungen die Vermehrung von Bakterien verhindert, wobei hier in der Regel Spezies- und oft sogar Stammunterschiede auftreten. MHK-Werte werden in Flüssigkultur (Bouillon) oder auf Agarplatten-Kulturen mittels Reihenverdünnungstest bestimmt. Als Vergleichswerte werden MHK_{50} und MHK_{90} herangezogen, die 50 % bzw. 90 % der Keime einer Spezies an der Vermehrung hindern. Die Definition der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) ist die Wirkstoffmenge pro Volumen, die 99,9 % der Population des untersuchten Bakterienstammes abtötet.

In der *in-vivo* Situation (Patient, Versuchstier) gilt ein Krankheitserreger als sensibel gegen ein bestimmtes Antiinfektivum, wenn am Infektionsherd bei therapeutisch üblicher Dosierung eine höhere ungebundene Konzentration als die MHK erreicht wird. Wenn mit einem Antibiotikum die MHK am Wirkort nur mit einer Dosierung oberhalb der üblichen Gabe – aber innerhalb der therapeutischen Breite der Substanz – erreicht werden kann, so spricht man von einem intermediär empfindlichen Keim. Als unempfindlich wird ein pathogener Bakterienstamm angesehen, wenn er nicht oder nur außerhalb der therapeutischen Breite auf eine Wirkstoffbehandlung anspricht. Die Grenzwert-Konzentrationen für sensibel, intermediär und resistent sind in verschiedenen Richtlinien wiedergegeben (DIN 58940-4, NCCLS M7-A5 [86]). Es wird versucht, diese auf *in-vivo* Behandlungen bezogenen Einteilungen *in-vitro* in wirkstoffabhängigen Wachstumsversuchen vorherzusagen.

2.2. MOXIFLOXACIN

Moxifloxacin ist ein 8-Methoxychinolon und gehört zur Gruppe der Gyrase-Hemmer. Diese Antiinfektiva wirken bakterizid durch die Hemmung der DNA-Gyrase vieler Prokaryonten, die notwendig ist für die Replikation des Bakteriengenoms. Die Entwicklung der Gyrase-Hemmer begann 1962 mit der Einführung der Nalixidinsäure als Therapeutikum von Harnwegsinfektionen [Lescher 77]. Wegen ihrer ungünstigen Pharmakokinetik, geringen Aktivität und Tendenz zur schnellen Resistenzentwicklung hat die Nalixidinsäure heute keine Bedeutung mehr. Auch die anderen geringfügig verbesserten Gyrase-Hemmer aus der Nalixidingruppe, beispielsweise Pipemidsäure, Cinoxacin und Rosoxacin, sind den fluorierten Chinolonen in ihrer Aktivität und in ihrem Wirkspektrum deutlich unterlegen. Mit der Entwicklung von Norfloxacin im Jahre 1980 durch Koga et al. war der Grundstein für die Entwicklung der Fluorochinolone gelegt [Koga 66]. Seitdem wurden mehr als 10.000 Derivate dieser Gruppe synthetisiert und zum Teil patentiert. Die neueren Fluorochinolone, zu denen auch Moxifloxacin gezählt wird, zeichnen sich durch ein breites Wirkspektrum (zahlreiche gram-positive-, gram-negative- sowie anaerobe Bakterien), eine hervorragende Pharmakokinetik, gute Bioverfügbarkeit und wenig Nebenwirkungen aus [Blondeau 8]. Moxifloxacin wurde von der Firma Bayer entwickelt und kam 1999 unter dem Namen Avalox[®] auf den Markt. Die Anwendungsgebiete sind Atemwegsinfektionen und Wundinfektionen der Haut und Weichteile.

Im Falle von Moxifloxacin zeigen Studien über die Bakterizidie-Kinetik in Bouillon, dass dieses Antibiotikum eine gute konzentrationsabhängige Aktivität gegen *S. aureus*, *S. pneumoniae* und verschiedene Enterokokken hat [Boswell 11, Dalhoff 24-25, Esposito 35-36, Klugmann 64, Malathum 79]. Bei Untersuchungen mit *S. pneumoniae*-Stämmen, die unterschiedliche Resistenzmuster gegen andere Antiinfektiva (z.B. β -Lactame, Makrolide) aufweisen, wird nach vier Stunden mit zweifacher MHK (0,24 $\mu\text{g/ml}$) eine Reduktion des Inokulums um 1,2 \log_{10} -Stufen erreicht, nach sechs Stunden um 2,74 \log_{10} -Stufen. Mit vierfacher MHK (0,48 $\mu\text{g/ml}$) wird nach sechs Stunden eine Reduktion um 3,75 \log_{10} -Stufen, also ein bakterizider Effekt erzielt [Boswell 11, Klugmann 64].

Die Grenzwert-Konzentrationen für Sensibilität bzw. Resistenz gegen Moxifloxacin liegen bei 1,0 µg/ml bzw. 4,0 µg/ml. Demnach sind alle Bakterien mit einem MHK-Wert $\leq 1,0$ µg/ml sensibel, Bakterien mit einem MHK-Wert von $> 1,0$ µg/ml und $< 4,0$ µg/ml intermediär empfindlich und alle Keime mit einem MHK-Wert $\geq 4,0$ µg/ml resistent für Moxifloxacin.

2.3. LINEZOLID

Mit der Synthese der ersten Oxazolidinone in den USA im Jahre 1987 wurde eine neuartige Strukturklasse gefunden und weiterentwickelt [Slee 111]. Linezolid ist der erste für therapeutische Zwecke zugelassene Vertreter dieser neuen rein synthetischen Wirkstoffklasse. Linezolid greift in den Ablauf der bakteriellen Proteinbiosynthese ein und wirkt wie andere Antibiotika mit diesem Wirkort vor allem bakteriostatisch. Eine Kreuzresistenz zwischen Oxazolidinonen und anderen, in den Prozess der Proteinbiosynthese eingreifenden Antibiotika, ist bisher nicht bekannt und wird aufgrund der unterschiedlichen Angriffsstelle auch nicht erwartet.

Studien zur Bakterizidie-Kinetik von Linezolid mit einigen *S. aureus*-, *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolaten und einer Vielzahl anderer Keime in Bouillon belegen, dass dieses Antibiotikum in therapeutisch erreichbaren Dosierungen eine bakteriostatische Wirkung hat [Bostic 9, Gradelski 42, Rybac 103, Wise 118, Zurenko 120-121]. Selbst bei Verwendung der vierfachen MHK (16 µg/ml) wird innerhalb 24 Stunden nur eine Reduktion des Inokulums bei *S. aureus*-Isolaten und Enterokokken um weniger als 2 \log_{10} -Stufen erreicht [Bostic 9]. Bei sehr hohen Konzentrationen wird gegen einige Streptokokken-Spezies hingegen ein bakterizider Effekt erzielt [Rybak 103, Wise 118, Zurenko 120-121]. Beispielsweise tritt bei *S. pneumoniae*-Stämmen bei der vierfachen minimalen Hemmkonzentration ein bakterizider Effekt ein. Das Inokulum wird innerhalb von 24 Stunden um 3 - 4 \log_{10} -Stufen reduziert [Zurenko 121].

Linezolid hat eine starke Aktivität gegen gram-positive Erreger einschließlich multiresistenter Staphylokokken, Pneumokokken und Enterokokken, sowie gegen einige Mykobakterien-Spezies [Diekema 29, Zurenko 120]. Gram-negative Bakterien werden durch Oxazolidinone in ihrem Wachstum nicht gehemmt. Allerdings hemmen in zellwandfreien Extrakten Vertreter dieser Wirkstoffklasse überraschenderweise auch die Ribosomen gram-negativer Bakterien. Da bestimmte Mutanten von gram-negativen Bakterien mit veränderter Zellwandpermeabilität eine Oxazolidinonempfindlichkeit zeigen, wird vermutet, dass das geringe Penetrationsvermögen durch die Zellwand die Ursache der natürlichen Linezolid-Unempfindlichkeit bei gram-negativen Bakterien darstellt [Daly 26, Zurenko 121].

Linezolid verfügt über gute pharmakokinetische Eigenschaften und eine hervorragende Bioverfügbarkeit, die nahezu 100 % nach oraler Gabe beträgt [Diekema 29]. Es kam im Jahr 2000 unter dem Namen Zyvox[®] von der Firma Pharmacia Inc. auf den Markt und ist zugelassen für die Behandlung von Haut- und Weichteilinfektionen, Pneumonien, sowie Infektionen mit Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen.

Die Grenzwert-Konzentrationen für Sensibilität bzw. Resistenz, die bei der NCCLS eingereicht wurden, liegen für Linezolid bei 2,0 µg/ml bzw. 8,0 µg/ml. Demnach sind alle Bakterien mit einem MHK-Wert $\leq 2,0$ µg/ml sensibel, Bakterien mit einem MHK-Wert von $> 2,0$ µg/ml und $< 8,0$ µg/ml intermediär empfindlich und alle Keime mit einem MHK-Wert $\geq 8,0$ µg/ml resistent für Linezolid.

2.4. VORKOMMEN UND KLINISCHE BEDEUTUNG DER IN DIESER STUDIE BETRACHTETEN BAKTERIENSPEZIES UND –STÄMME, SOWIE DEREN EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER MOXIFLOXACIN UND LINEZOLID

Streptococcus pneumoniae verursacht beim Menschen Infektionen des Respirationstrakts. Bei der Therapie gilt bisher als Mittel der Wahl Penicillin G. Zu Beginn der siebziger Jahre wurden in den USA und in Papua/Neu Guinea erstmals einzelne Isolate von *S. pneumoniae*-Stämmen beschrieben, die eine verminderte Sensibilität gegenüber Penicillin G hatten. 1977 treten zum ersten Mal in einem Hospital in Südafrika innerhalb eines kurzen Zeitraums mehrere Isolate auf, die alle denselben Serotyp 6A besitzen und nicht nur eine hohe β -Lactam-Unempfindlichkeit, sondern auch Resistenzen gegen Tetracyclin, Clindamycin, Erythromycin, Rifampicin, Streptomycin und/oder Co-trimoxazol aufweisen [Klugmann 64-65]. Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen eine weltweite Zunahme der Antibiotika-resistenten *S. pneumoniae*-Isolate [Ballow 6, Breiman 13, Chromarat 20, Decousser 28, Doern 30, Hakenbeck 43, Hsueh 53, Korn 68, Kresken 71, Lee 76, Linãres 78, Marton 81, Reacher 95, Reinert 98, Stock 112].

Untersuchungen zur Aktivität von Moxifloxacin gegenüber *S. pneumoniae* zeigen, dass es bisher keine resistenten Stämme gibt. Die ermittelten MHK-Werte liegen im Bereich von 0,063 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,25 $\mu\text{g/ml}$ [Dalhoff 25, Decousser 28, Esposito 35-36, Fass 37, Hardy 44, Klugmann 64, Reinert 96, Woodcock 119]. Weiterhin beschreiben einige Autoren, dass Moxifloxacin gegen *S. pneumoniae*-Stämme im Vergleich zu anderen getesteten Substanzen (β -Lactam-Antibiotika, Makrolide, andere Chinolone) in therapeutischer Dosis (0,12 $\mu\text{g/ml}$) die größte Aktivität hat. Diese ist unabhängig von der Empfindlichkeit bzw. Resistenz der untersuchten Isolate gegenüber Penicillinen oder Makroliden [Dalhoff 25, Klugmann 64, Reinert 96].

Für die Aktivität von Linezolid gegen Pneumokokken sind MHK_{90} -Werte zwischen 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Von Linezolid-resistenten *S. pneumoniae*-Isolaten wird bisher nicht berichtet [Andes 4, Ballow 6, Gemmell 40, Patel 92, Wise 118, Zurenko 122].

Staphylococcus aureus, der als Teil der physiologischen Flora Haut und Schleimhäute besiedelt, ist ebenfalls ein wichtiger Infektionserreger und verursacht vor allem Dermatiden oder Septikämien. In verschiedenen Studien zeigt sich auch hier bei Humanisolaten weltweit eine Zunahme des Anteils an resistenten Stämmen, beispielsweise ist in Europa in den letzten Jahren eine Zunahme des Anteils an Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA) von ca. 2,0 % bis über 30 % zu verzeichnen [Kresken 69-72, Reacher 95].

Untersuchungen über die Empfindlichkeit von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Moxifloxacin ergeben für Methicillin-empfindliche *S. aureus*-Isolate MHK-Werte im Bereich von 0,063 µg/ml bis maximal 2,0 µg/ml. Es wurden bisher keine Moxifloxacin-resistenten Stämme mit einem MHK-Wert $\geq 4,0$ µg/ml gefunden. Die MHK₉₀ liegt in einem Bereich von 0,063 µg/ml [v. Eiff 33, Fass 37] bis 0,125 µg/ml [Berrington 7, Dalhoff 25, Decousser 28, Hardy 44, Woodcock 118]. Bei Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA) sind die für Moxifloxacin ermittelten MHK-Werte höher. Sie liegen im Bereich von 2,0 µg/ml bis 8,0 µg/ml [Berrington 7, Dalhoff 25, Decousser 28, v. Eiff 33, Fass 37, Hardy 44, Woodcock 118]. Decousser et al. ermitteln unter den MRSA-Stämmen 35,8 % Moxifloxacin-resistente Isolate [Decousser 28]. Kayser et al. testen verschiedene *Staphylococcus* spp. und finden insgesamt 11,2 % Moxifloxacin-resistente Isolate. Diese weisen ebenso Resistenzen gegenüber Methicillin und Ciprofloxacin auf [Kayser 60].

Untersuchungen mit Linzolid zeigen, dass die MHK₉₀-Werte für dieses Antibiotikum gegenüber *S. aureus*-Isolaten wie auch andere *Staphylococcus* spp. im sensiblen bzw. intermediär-empfindlichen Bereich von 1,0 µg/ml bis 4,0 µg/ml liegen. Die ermittelten MHK-Werte sind unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit einer Resistenz gegen andere Antiinfektiva, wie z.B. Methicillin oder Vancomycin [v. Eiff 33, Patel 92, Zurenko 121]. Nur in einer Studie [Tsiodras 114] wird von einem Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stamm berichtet, der unempfindlich gegen Linezolid ist.

Enterokokken, wie beispielsweise *Enterococcus faecalis* oder *Enterococcus faecium*, kommen als Saprophyten im Darmtrakt von Mensch und Tier vor, sind aber auch beim Menschen die zweithäufigsten Erreger nosokomialer Wund- und Harnwegsinfektionen und werden sogar in einzelnen Fällen auch bei Septikämien isoliert [Kampf 59, Rosenthal 100]. Nach dem Auftreten erster Glycopeptid-resistenter Enterokokken 1986 [Uttley 117] ist die Behandlung dieser Infektionen in vielen Fällen schwieriger, hat doch jahrzehntelang Vancomycin mit einer zuverlässigen Wirksamkeit zur Verfügung gestanden. Studien verschiedener internationaler Arbeitsgruppen zeigen in den letzten zwölf Jahren eine stetige Zunahme des Anteils an Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen [Hsueh 53, Kolbert 67, Kresken 69-72, Reacher 95, Reinert 97,99, Stock 112]. Auch bei Enterokokken beschränkt sich die Resistenzzunahme nicht nur auf Vancomycin und andere Glycopeptide, sondern es werden zunehmend auch verminderte Empfindlichkeiten gegen Aminoglycoside, Makrolide und Sulfonamide gefunden [Kresken 69-72].

Gegen Enterokokken ist die Wirksamkeit von Moxifloxacin variabel und oft nicht ausreichend für einen klinischen Behandlungserfolg. Verschiedene Autoren ermittelten MHK-Werte im Bereich von 0,12 µg/ml bis mehr als 32 µg/ml [Fass 37, Hardy 44, Woodcock 118]. Die untersuchten *E. faecalis*-Isolate waren zu ca. 40 % Moxifloxacin-resistent (MHK \geq 4,0 µg/ml), während der Anteil resistenter Keime bei Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten 100 % erreichte. Die gefundenen MHK-Werte reichten bis über 32,0 µg/ml [Fass 37, Hardy 44, Woodcock 118].

Angaben in der Literatur berichten von Linezolid-sensiblen bzw. intermediär-empfindlichen Enterokokken mit MHK-Werten im Bereich von 0,25 µg/ml bis 4,0 µg/ml [Ballow 6, Bostic 9, Gemell 40, Jones 58, Patel 92, Wise 118, Zurenko 122], unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit einer Resistenz gegen andere Antiinfektiva. Jedoch gibt es auch bereits einzelne Linezolid-resistenten *E. faecium*-Isolaten (MHK \geq 8,0 µg/ml): Im Jahr 1999 entdeckt die Arbeitsgruppe um Zurenko erstmals einen Linezolid-resistenten *E. faecium*-Stamm [Zurenko 121]; das Linezolid-resistente *E. faecium*-Isolat, das von Gonzales et al. im Jahr 2000 in einem Hospital in Chicago, USA, isoliert wird, ist zusätzlich Vancomycin-resistent [Gonzales 41].

Auch Herrero berichtet 2001 von einem Linezolid-resistenten *E. faecium*-Stamm (MHK: 16 µg/ml), der ebenfalls unempfindlich gegen Vancomycin ist, aber sensibel für Quinupristin/Dalfopristin [Herrero 48].

2.5. ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVITÄT ANTIMIKROBIELLER WIRKSTOFFE VON DER ZUSAMMENSETZUNG DES TESTMEDIUMS

Aktivitätsbestimmungen von Antibiotika werden gemäß DIN 58940 oder NCCLS M7-A5 [NCCLS 86] bislang immer in künstlichen Nährmedien, die auf Peptonbasis hergestellt sind, durchgeführt. Zahlreiche Autoren beschreiben, dass die Aktivität eines Antiinfektivums unter anderem von der Zusammensetzung und den chemischen Eigenschaften des Testmediums und der Umgebung abhängig ist [Andrews 5, Boswell 12, Helm 45-46, Johnson 56, King 62, Lamp 75, Naber 84, Nagl 85, Rubinstein 102, Seral 105, Shah 107-109, Woodcock 119]. Dies wird durch die schon lang bekannte Beobachtung illustriert, dass die Ergebnisse bei der Verwendung von Produkten verschiedener Hersteller und sogar von verschiedenen Chargen desselben Produzenten stark variieren können [Andrews 5, Burkhardt 16]. Beispielsweise wurden verschiedene Chargen Isosensitest-Agar von der Firma Oxoid aus den Jahren 1991 bis 1999 zur MHK-Bestimmung von Aminoglycosiden (z.B. Gentamicin) gegen *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 benutzt. Die Ergebnisse differierten um drei bis vier Titerstufen [Andrews 5].

In der Literatur findet man bei unterschiedlichen Autoren Befunde, die darauf hinweisen, dass die Aktivität antimikrobieller Substanzen in verschiedenen Körperflüssigkeiten eingeschränkt oder, seltener, auch verstärkt wird. Einige Substanzklassen wie beispielsweise β -Lactam-Antibiotika, Aminoglycoside, Makrolide aber auch die Fluorochinolone zeigen starke Aktivitätsverluste bei einer pH-Verschiebung in den leicht sauren Bereich von pH 4 bis 6 [Maurin 83]. Beispielsweise vergleichen Naber et al. die Aktivität von β -Lactam-Antibiotika, Aminoglycosiden und Co-trimoxazol in Mueller-Hinton-Bouillon mit der in Urin und stellen fest, dass die antibakterielle Wirkung in Urin durchweg geringer ist. Vermutlich spielt hier der leicht

saure pH-Wert des Harns eine entscheidende Rolle [Naber 84]. Auch an anderen Wirkorten mit erniedrigtem pH-Wert wurde ein negativer Einfluss auf die Wirksamkeit von Antibiotika festgestellt [Kim 61, Lamp 75, Naber 84, Seral 105]. Helm et al. testen verschiedene Antiinfektiva in Galle und finden eine durchweg geringere Aktivität als in Bouillon [Helm 46].

Aber auch im Blut bzw. Serum oder im Liquor wird trotz des nahezu neutralen pH-Wertes von ungefähr 7,4 eine oft negative Beeinflussung der Antibiotikawirksamkeit gefunden. Beispielsweise berichten King et al. und Johnson et al., dass bei der Verwendung von Blut die MHK-Werte für Quinupristin/Dalfopristin im Vergleich zu Bouillon um das Vierfache ansteigen [Johnson 56, King 62]. Bei Versuchen mit Faropenem steigt der MHK-Wert um drei \log_2 -Verdünnungsstufen bei Zugabe von 70 % humanem Serum. Faropenem hat eine Proteinbindung von ca. 95 % [Boswell 12] und zahlreiche Autoren bestätigen den *in-vitro* Wirkungsverlust von Antiinfektiva, die eine hohe Proteinbindung haben (mehr als 85 %). Bei Zugabe von Serum oder Blut zum Testmedium tritt *in-vitro* meist ein Aktivitätsverlust auf, da an Eiweißbausteine des Blutes oder Serums gebundene Antibiotikamoleküle ihre Aktivität verlieren [Boswell 12, Collignon 22, Lacey 74, Moretti 82]. Beispiele für geringe Wirkungsbeeinflussung von Antibiotika durch Körperflüssigkeiten finden sich bei Boswell et al. und Kim et al., die die beiden neuen Substanzen HMR3647, ein Ketolid, sowie CFC-222, ein Fluorochinolon untersuchten, und keinen Aktivitätsverlust bei der Zugabe von Serum finden [Boswell 10, Kim 61]. Auch bei Vancomycin-Wirksamkeitsbestimmungen in Liquor ermitteln Nagl et al. keinen signifikanten Unterschied seiner Aktivität gegen Staphylokokken im Vergleich zur Aktivität in Bouillon [Nagl 85].

Hingegen berichten Shah et al. bemerkenswerterweise von einem paradoxen Effekt in Blut bei Zugabe subinhibitorischer Cephalosporin-Konzentrationen: *E. coli* - Isolate wachsen in Blut, das Ceftriaxon bzw. Cefotetan in einer Konzentration enthält, die nur 25 % der MHK entspricht, besser als in antibiotikafreiem Blut [Shah 108].

Für Moxifloxacin gibt es bisher nur wenige Publikationen über die Beeinflussung der Aktivität durch Körperflüssigkeiten: Zugabe von bis zu 70 % humanes Serum zum Testmedium haben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit [Rubinstein 102, Woodcock 119].

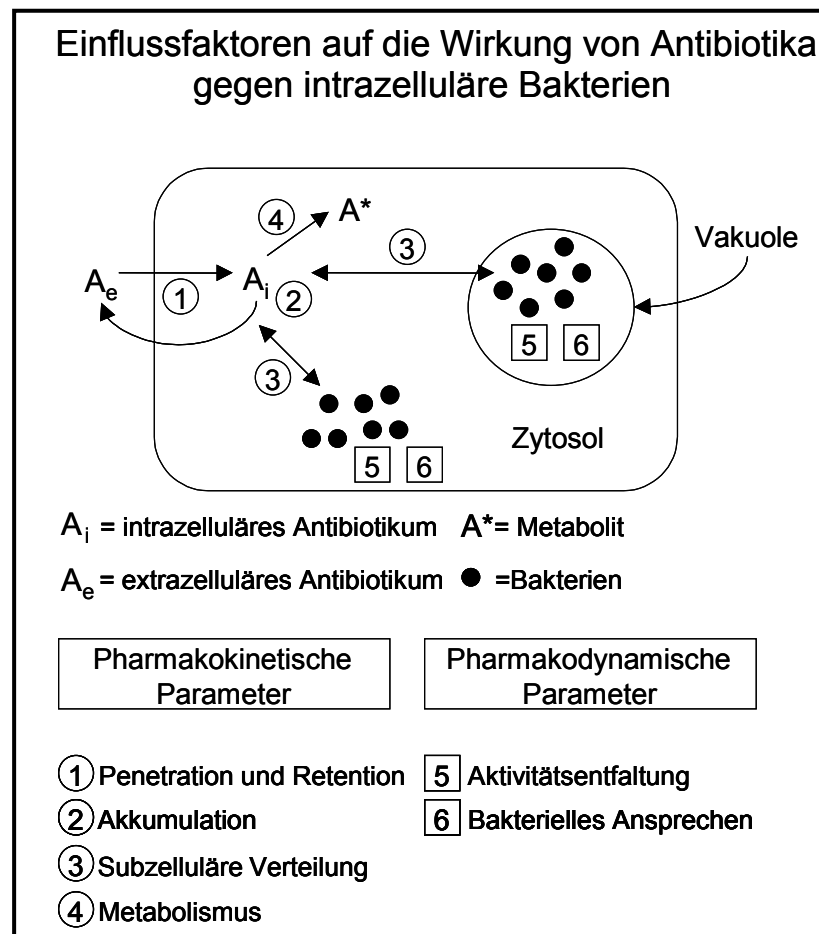
Bei einer pH-Wert Änderung von 7,3 auf 5,0 steigt jedoch der MHK-Wert gegen *S. aureus* ATCC 25932 auf das vierfache [Seral 105].

Im Falle der Oxazolidinone findet man ebenfalls nur wenige Angaben in der Literatur über den Einfluss von Körperflüssigkeiten auf die Wirksamkeit. Neuere Untersuchungen mit Oxazolidinonen zeigen keinen Aktivitätsverlust bei Zugabe von bis zu 40 % humanem Serum [Zurenko 122]. Über einen Einfluss des pH-Wertes findet man bislang keine Literaturangaben.

2.6. AKTIVITÄT ANTIMIKROBIELLER SUBSTANZEN GEGEN INTRA-ZELLULÄRE BAKTERIELLE KRANKHEITSERREGER

Obwohl die Mehrzahl der human- und tierpathogenen Bakterien ausschließlich extrazellulär im Wirtsorganismus vorkommen, gibt es eine Reihe wichtiger Krankheitserreger, die obligat (z.B. Rickettsien, Chlamydien, Coxiellen) oder fakultativ (z.B. Legionellen, Listerien, Staphylokokken, Pneumokokken, Enterokokken oder auch Salmonellen) intrazellulär vorkommen und sich dort in vielen Fällen sogar vermehren [Carryn 19, Hof 51, Mandell 80, Maurin 83, Rous 101, Tulkens 115-116]. Hierbei werden oft sogar professionelle Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten kolonisiert, wobei deren mikrobizides Arsenal (z.B. pH-Senkung, Hydrolasen, Sauerstoff- und Stickstoff-haltige Radikale wie $O_2^{\bullet-}$, NO^{\bullet} , OH^{\bullet} , bakterizide Peptide, u.a.m.) auf vielfältige Weise umgangen, ausgeschaltet oder im Extremfall sogar toleriert wird. Gelegentlich erfolgt auch die Besiedlung normalerweise nicht-phagozytierender Zellen durch aktives Eindringen oder induzierte Phagozytose. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Staphylokokken- und Streptokokken-Arten liegen vorwiegend im Zytosol vor und sind nicht wie beispielsweise Coxiellen von einer Wirtsmembran umgeben [Hof 51, Mandell 80]. Einen Überblick über die Einflüsse der Pharmakokinetik und -dynamik auf die Aktivitätsentfaltung von Antibiotika gegen intrazelluläre Erreger soll im Folgenden wiedergeben werden.

Abbildung 2.6.1. Einflussfaktoren auf die Wirkung von Antibiotika gegen intrazelluläre Bakterien [Tulkens 115 - 116]



Eine Vorbedingung für die Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber intrazellulären bakteriellen Krankheitserregern ist das Eindringen des Wirkstoffs in die Wirtszelle [Schwab 104]. Grundsätzlich können viele Antiinfektiva in Makrophagen oder polymorphkernige Granulozyten aufgenommen werden und sich dort zum Teil auch anreichern [Tulkens 115-116]. Bei Vorliegen einer Entzündungsreaktion ist die Permeabilität biologischer Membranen erhöht. Dadurch wird die Aufnahme von Antiinfektiva in Mammalierzellen noch weiter begünstigt [Garcia 38-39, Pascual 90-91].

Doch auch bei nachgewiesener Aufnahme oder sogar Akkumulation ist eine bakteriostatische bzw. bakterizide Aktivität nicht garantiert, da Sequestrierung in Organellen erfolgen oder die Bindung an intrazelluläre Proteine die Effektivität dämpfen kann. Eine Substanz wird also je nach Zellkompartiment, in dem sie sich befindet, eine unterschiedliche Aktivität entfalten.

Ebenso ist eine starke pH-Abhängigkeit der Wirksamkeit vorhanden. Antiinfektiva zeigen im Allgemeinen ausgeprägte pH-Optima bezüglich ihrer Aktivität. Im Phagolysosom liegt eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich von etwa pH 5,0 – 6,0 vor. Seral et al. haben bei ihren *in-vitro* Untersuchungen in Bouillon herausgefunden, dass bei einer pH-Wert-Verschiebung in den leicht sauren Bereich Moxifloxacin an Aktivität verliert: Die MHK gegen *S.aureus* ATCC 25923 beträgt bei pH 7,3 0,06 µg/ml und bei bei pH 5,0 0,25 µg/ml [Seral 105]. Ebenso wird die Akkumulation mancher Antibiotika in der Wirtszelle vom intrazellulären pH-Wert beeinflusst. β-Lactam Antibiotika reichern sich vermutlich aufgrund ihrer Eigenschaften als schwache Säuren in dem intrazellulär herrschenden Milieu nur schlecht an [Tulkens 115-116]. Moxifloxacin, eine schwache Base, reichert sich hingegen um das etwa fünf- bis sechsfache intrazellulär in Monozyten an. Die Anreicherung ist in infizierten Makrophagen, deren Phagolysosom einen leicht sauren intrazellulären pH-Wert hat, stärker als in nicht infizierten [Carlier 17, Seral 105].

Ein weiterer Aspekt, der die Übertragbarkeit der extrazellulär ermittelten MHK-Werte auf die intrazelluläre Aktivität eines Antibiotikums einschränkt, ist die intrazelluläre Keimkonzentration. Die MHK wird gemäß NCCLS M7-A5 extrazellulär in Bouillon mit einer Keimdichte von $1 - 5 \times 10^5$ KBE/ml bestimmt [NCCLS 86]. Bei *in-vitro* Untersuchungen kann hingegen die intrazelluläre Bakteriendichte von beispielweise *S. aureus* ATCC 25923 mehr als 10^7 KBE/ml betragen [Paillard 89]. Paillard et al. zeigen für *S. aureus* ATCC 25923, dass extrazellulär bei einer Erhöhung der Bakteriendichte auf 10^7 KBE/ml die MHK für Moxifloxacin um eine Verdünnungsstufe ansteigt; von 0,25 µg/ml auf 0,5 µg/ml [Paillard 89].

Weiterhin spielt auch die Verweildauer eines Antiinfektivums in einer Zelle eine Rolle für deren Wirksamkeit. Carlier et al. beobachten, dass in Makrophagen, die mit *Legionella pneumophila* infiziert sind, nach 60 Minuten noch 20 – 30 % der ursprünglichen Konzentration des Fluorochinolons vorhanden ist. Bei nicht infizierten Zellen ist nach 60 Minuten kein Wirkstoff mehr nachzuweisen [Carlier 17].

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass ein Antiinfektivum, das in eine Mammalierzelle aufgenommen wird, durch dort vorhandene Enzyme metabolisiert wird und somit keine Aktivität mehr entfalten kann [Seral 105, Tulkens 114-115].

Die Problemlage, zu der die aufgeführten intrazellulären Bedingungen führen, wird im Folgenden nochmals exemplarisch für einige Antibiotikaklassen dargelegt.

Eine Reihe von Berichten belegen die schlechte oder nicht vorhandene Aufnahme für die überwiegende Zahl von β -Lactam-Antibiotika sowie von einigen Vertretern der Glykopeptide in Mammalierzellen [Tulkens 115-116]. Daher ist die Aktivität dieser Wirkstoffklassen gegenüber intrazellulären Keimen sehr gering. Aminoglykoside vermögen ebenfalls nicht die Plasmamembran von Mammalierzellen direkt zu durchdringen, werden aber über Pinozytose langsam aufgenommen, in den Lysosomen sequestriert und stark akkumuliert. Ihre Wirksamkeit ist gegenüber einer Reihe von intrazellulären Bakterien eher gering (z.B. Chlamydien, Rickettsien, Staphylokokken), während andere gut auf eine Behandlung ansprechen (z.B. Mykobakterien, *Francisella tularensis*). Die Faktoren, die diese zunächst widersprüchlichen Befunde erklären könnten, sind bisher nur unzureichend untersucht.

Die sich stark in Wirtszellen anreichernden Antibiotika aus den Klassen der Makrolide und Ketolide sowie das Clindamycin werden über einen Nucleosid-Transporter schnell in das Zytoplasma aufgenommen und können über diesen Transporter aber auch wieder an das Extrazellulärmedium abgegeben werden. Einige Berichte sprechen aber auch für eine zusätzliche Sequestrierung in sauren Organellen [Maurin 83]. Die Wirksamkeit von Makroliden und Ketoliden gegen eine Reihe von intrazellulären Keimen ist gut belegt [Seral 105, Tulkens 115-116].

Für Streptogramine hingegen sieht es nicht so günstig aus. Beispielsweise messen Herrera-Insua et al. hohe intrazelluläre Konzentrationen von Quinupristin/Dalfopristin. Jedoch ist die Aktivität der gleichen Konzentration extrazellulär in Bouillon gegen die getesteten *E. faecium*-Stämme deutlich größer. Demnach liegt intrazellulär ein Aktivitätsverlust vor [Herrera-Insua 47].

Fluorochinolone scheinen, wie andere lipophile Antibiotika, passiv durch die Plasmamembran von Wirtszellen zu diffundieren und sich im Zytosol moderat anzureichern [v.d.Broeck 15, Carlier 17, Carryn 19, Easmon 31-32, Garcia 38-39, Paillard 89, Pascual 90-91, Seral 105, Tulkens 115-116]. Jedoch korreliert die intrazelluläre Konzentration nicht mit der Aktivität der Substanz. Van den Broeck et al. zeigen, dass eine 3 - 4 mal höhere Konzentration von Trovafloxacin nötig ist, um den gleichen Effekt auf phagozytierte *S. aureus*-Stämme zu erzielen wie auf extrazelluläre, obwohl sich Trovafloxacin intrazellulär bis zu zehnfach anreichert [v.d. Broeck 14-15]. Ciprofloxacin akkumuliert in Granulozyten etwa um das Siebenfache. Es verfügt in der Zelle jedoch nur über $\frac{1}{15}$ seiner Aktivität [Carryn 19]. Paillard et al. zeigen, dass sich Moxifloxacin in infizierten THP-1 Monozyten um das etwa Sechsfache anreichert. Trotzdem ist die intrazelluläre Aktivität vergleichsweise schlecht: Während der getestete *S. aureus* – Stamm in Bouillon einen MHK-Wert von 0,2 µg/ml hat und dabei das Inokulum innerhalb von 3 – 5 Stunden um mehr als 3 log₁₀-Stufen reduziert, wird eine intrazelluläre Keimreduktion um eine log₁₀-Stufe erst bei einer extrazellulär vorliegenden Moxifloxacin-Konzentration von 0,5 µg/ml erreicht [Paillard 89]. Dies bedeutet, dass extrazellulär für Moxifloxacin mehr als die doppelte MHK vorhanden sein müsste, um intrazelluläre Erreger zu hemmen [Carryn 19, Jonas 57, Paillard 89].

Trotz des intrazellulären Aktivitätsverlusts der Chinolone, wird in therapeutisch erreichbaren Dosierungen eine bakterizide Wirkung erzielt. Mandell et al. testen die Aktivität verschiedener Antiinfektiva auf intrazelluläre *S. pneumoniae*-Stämme. Sie ermitteln für Fluorochinolone eine gute bakterizide Wirksamkeit auf phagozytierte Pneumokokken [Mandell 80]. Al-Nawas et al. zeigen, dass Moxifloxacin bei zehnfacher MHK gegen intrazelluläre Keime einen bakteriziden Effekt hat [Al-Nawas 2].

Über die Aktivität von Moxifloxacin auf intraphagozytäre *S. aureus* und *S. pneumoniae* findet man bisher nur vereinzelte, über intrazelluläre Enterokokken keine Angaben in der Literatur. Über die Aktivität von Moxifloxacin speziell in Granulozyten gibt es keinerlei Untersuchungen. Über die intrazelluläre Wirksamkeit von Linezolid findet man ebenfalls keine Berichte in der Literatur.

2.7. THEMENSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit werden am Beispiel der extrazellulären, aber gelegentlich auch fakultativ intrazellulär vorkommenden Krankheitserreger *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* die Problemkomplexe der Abhängigkeit der Antibiotikawirksamkeit von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums und von der extra- bzw. intrazellulären Lokalisation von Keimen aufgegriffen. Zu Beginn dieser Arbeit waren über die Aktivität von Moxifloxacin, Linezolid, Penicillin, Oxacillin und Cefuroxim in Blut gegenüber *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* keine experimentellen Studien zu finden. Weiterhin war die intrazelluläre Aktivität von Moxifloxacin und Linezolid bei Infektionen mit den obengenannten Keimen nicht bzw. nur wenig ausführlich [Al Nawas 2] belegt. Die hier vorgelegten Ergebnisse sind ein Beitrag zur Schließung dieser Kenntnislücke.

3. MATERIAL

3.1. BAKTERIENSTÄMME

3.1.1. PNEUMOKOKKEN

Alle acht *Streptococcus pneumoniae*-Stämme sind Isolate von Patienten aus dem Zentrum der Inneren Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/Main. Die Identifizierung erfolgt aufgrund makroskopischer Erscheinung, der Empfindlichkeit gegenüber Optochin (Becton Dickinson, Best-Nr.: 231046), sowie der Gallelöslichkeit der Kolonien mit Desoxycholat (Becton Dickinson, Best-Nr.: 4361183).

Von den acht Stämmen sind vier Penicillin-sensibel und vier Penicillin-resistent (siehe Tabelle 3.1.1.)

Tabelle 3.1.1.: Auflistung der verwendeten *S. pneumoniae* - Stämme

Stamm	Verhalten gegenüber Penicillin
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 40 S	Penicillin-sensibel
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 50 S	Penicillin-sensibel
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 61 S	Penicillin-sensibel
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 62 S	Penicillin-sensibel
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 13 R	Penicillin-resistent
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 21 R	Penicillin-resistent
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 53 R	Penicillin-resistent
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 56 R	Penicillin-resistent

3.1.2. STAPHYLOKOKKEN

Die beiden verwendeten Staphylokokken-Isolate *Staphylococcus aureus* 1538/00 und *Staphylococcus aureus* 2394/00 sind Sepsisstämme von Patienten aus dem Zentrum der Inneren Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt/Main. Die Identifizierung erfolgt aufgrund makroskopischer Erscheinung, einem positiven Katalasetest, Nachweis der Koagulasebildung (Biomérieux, Slidex Staph-Kit, Best-Nr.: 73113), sowie handelsüblicher Identifizierungssysteme von Biomérieux (Api-Staph, Biomérieux, Best-Nr.: 20500). Bei *Staphylococcus aureus* MRSA ND handelt es sich um einen Methicillin-resistenten Stamm aus Norddeutschland. Als Qualitätskontrollstamm wird *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 verwendet, der aus der „American Type Culture Collection“ stammt.

3.1.3. ENTEROKOKKEN

Enterococcus faecium 14758/99 ist ein Sepsisstamm von einem Patienten aus dem Zentrum der Inneren Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/Main. Die Identifizierung erfolgt aufgrund makroskopischer Erscheinung, dem Nachweis der Aeskulinspaltung, sowie handelsüblicher Identifizierungssysteme von Biomérieux (Api-Strep, Biomérieux, Best-Nr.: 20506). Des Weiteren werden uns zwei Stämme von Prof. P. Courvalin aus Paris zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um *Enterococcus faecalis* VS 83 und *Enterococcus faecium* BM 4147. Beide Stämme weisen eine verminderte Sensibilität gegenüber Vancomycin auf. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dient als Qualitätskontrollstamm

3.2. NÄHRMEDIEN

3.2.1. BLUT

Das humane Blut stammt von freiwilligen, gesunden Spendern aus der Poliklinik des Universitätsklinikums in Frankfurt/Main. Es wird direkt nach Abnahme mit CPDA-1 (Sarstedt, Best-Nr.: 01.1610.001) in einer Konzentration von 1 ml pro 8 ml Blut ungerinnbar gemacht, stabilisiert und am gleichen Tag für die Versuchsreihen verwendet. CPDA-1 enthält Citronensäure, Natriumcitrat, Natriumhydrogenphosphat, Glucose und Adenin.

Das Schafsblut wird von gesunden Tieren der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums entnommen. Das Blut wird ebenfalls mit CPDA-1 wie oben beschrieben behandelt und am gleichen Tag verwendet.

3.2.2. SERUM

Für die Versuchsreihen wird ausschließlich humanes Serum verwendet.

Zur Herstellung des Serums lässt man ein Teströhrchen mit Spenderblut (Serumröhrchen, Sarstedt, Best-Nr.: 01.1610.014) mindestens eine Stunde gerinnen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 500 RZB wird das Serum abpipettiert. Da zur Opsonisierung gepooltes Serum benötigt wird, werden die Seren mehrerer Probanden gemischt und in Portionen zu je 500 µl bei ca. - 80°C tiefgefroren.

3.2.3. SONSTIGE MATERIALIEN

Die verwendeten Nährmedien und sonstigen Materialien sind im Anhang aufgelistet.

3.3. ANTIBIOTIKA

3.3.1. CEFUROXIM

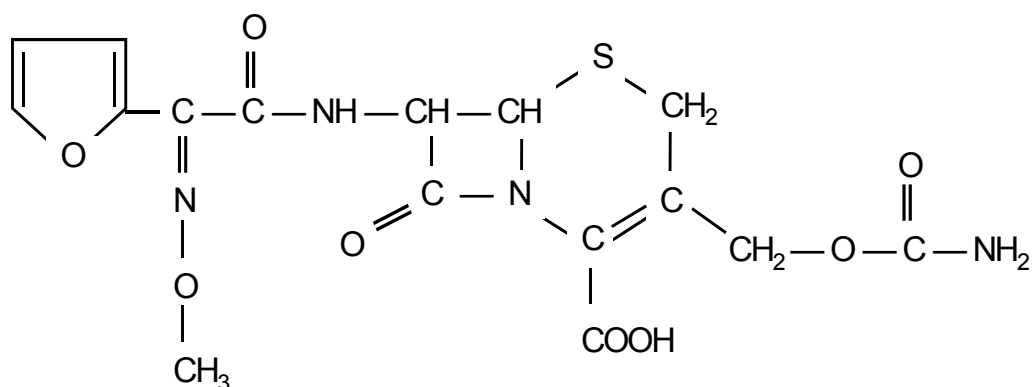
Cefuroxim-Natrium (Charge-Nr.: 9B05, Reinheit: 100 % bezogen auf die wasserfreie Substanz) wurde freundlicherweise von der Firma Glaxo-Wellcome zur Verfügung gestellt. Die Substanz ist sehr gut löslich in Wasser.

Es handelt sich hierbei um ein Antiinfektivum aus der Gruppe der Cephalosporine. Diese sind bicyclische β -Lactam-Antibiotika mit naher Verwandtschaft zu den Penicillinen und bestehen aus einem Dihydrothiazinring und einem β -Lactamring.

Cefuroxim ist ein weitgehend β -Lactamase stabiles Cephalosporin mit einer guten Aktivität gegenüber grampositiven Erregern, besonders Streptokokken. Da keine Resorption nach oraler Gabe erfolgt, wird es ausschließlich i.v. appliziert. Die Halbwertszeit beträgt ca. 70 Minuten und die Plasmaeiweißbindung 20 %.

Kurzzeichen: CXM

Strukturformel:



Quelle: Simon/Stille [109]

3.3.2. LINEZOLID

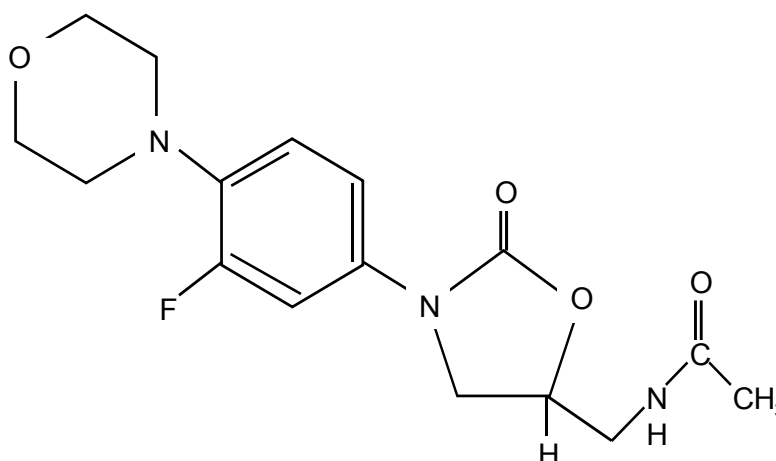
Linezolid wurde entwickelt von Pharmacia & Upjohn. Die zur Verfügung gestellte Substanz (Charge-Nr.: D21500-5148-JLH-48M) hat einen Reinheitsgehalt von 100 % bezogen auf die wasserfreie Trockenmasse. Sie ist wasserlöslich und fotosensibel.

Es ist der erste Vertreter der neuen Substanzklasse der Oxazolidinone. Linezolid greift in den Translationsprozess der bakteriellen Proteinbiosynthese ein und wirkt somit bakteriostatisch. Aufgrund seines Wirkungsmechanismus sind bisher keine Parallelresistenzen mit anderen Antibiotika bekannt.

Es soll eingesetzt werden zur Behandlung von unkomplizierten Pneumonien, sowie Infektionen durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*- bzw. Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme. Linezolid kann oral oder i.v. appliziert werden und hat eine Halbwertszeit von 7 Stunden. Die Plasmaproteinbindung beträgt etwa 31 %.

Kurzzeichen: LZD

Strukturformel:



Quelle: Simon/Stille [109]

3.3.3. MOXIFLOXACIN

Moxifloxacin (Chargen-Nr.: 502714, Reinheitsgehalt: 99,7 %) ist von Bayer Vital, Wuppertal. Es hat bei 25°C eine gute Wasserlöslichkeit (maximal ca. 24 mg/ml).

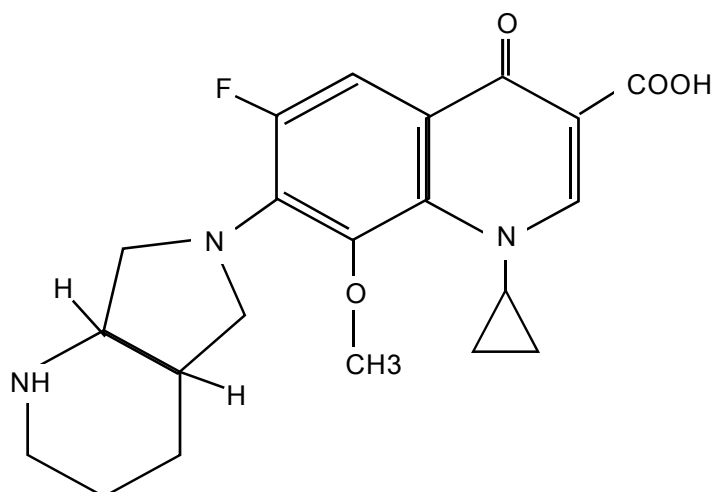
Es handelt sich um ein 8-Methoxyfluorochinolon mit einer Cyclopropylgruppe in Position 1 (siehe Strukturformel). Es ist der Gruppe der Gyrase-Hemmer zuzuordnen und hemmt die bakteriellen DNS-Topoisomerasen, welche zur Nukleinsäure-Synthese benötigt werden.

Moxifloxacin verfügt über ein breites Wirkungsspektrum, sowohl gegen grampositive als auch gegen einige aerobe gramnegative Bakterien. Es wird vorwiegend zur Therapie ambulanter Atemwegsinfektionen eingesetzt.

Es kann oral oder i.v. verabreicht werden. Seine Halbwertszeit beträgt etwa 13 Stunden; die Plasmaeiweißbindung ca. 40 %.

Kurzzeichen: MXF

Strukturformel:



Quelle: Simon/Stille [109]

3.3.4. OXACILLIN

Oxacillin-Natrium-Monohydrat (Chargen-Nr.: 3203 899-1, Gehalt: 98,7 %) wurde freundlicherweise von der Firma KVP Pharma aus Kiel zur Verfügung gestellt. Es ist in Wasser gut löslich.

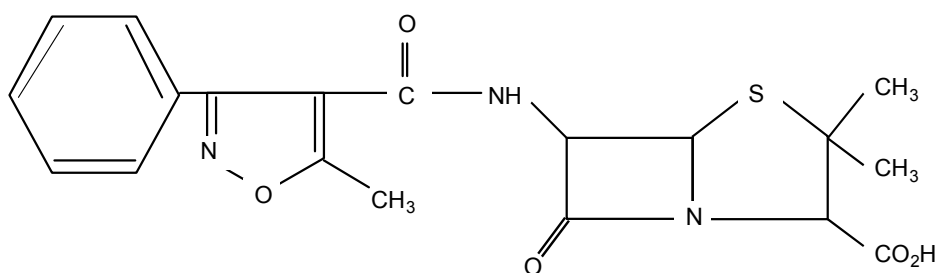
Bei der Substanz handelt es sich um ein Penicillinase-festes Isoxazolympenicillin aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika. Oxacillin verfügt über eine gute Wirksamkeit gegen Penicillinase-bildende Staphylokokken, allerdings ist seine MHK gegen Streptokokken um den Faktor 10 höher als bei Penicillin G.

Oxacillin ist für die orale Anwendung geeignet, kann aber auch i.m. oder i.v. appliziert werden.

Die Halbwertszeit beträgt 25 Minuten; die Plasmaeiweißbindung ist mit ca. 93 % sehr hoch. Oxacillin verfügt über schlechte Gewebepenetrationseigenschaften.

Kurzzeichen nach DIN 58940: OXA

Strukturformel:



Quelle: Simon/Stille [109]

3.3.5. PENICILLIN G, BENZYL PENICILLIN (Grünethal)

Penicillin G ist ein β -Lactam-Antibiotikum mit einer Benzylgruppe. Es ist empfindlich gegen bakterielle β -Lactamasen. Seine bakterizide Wirkung auf proliferierende Keime beruht auf der Hemmung der Zellwandsynthese durch Blockierung der bakteriellen Transpeptidase.

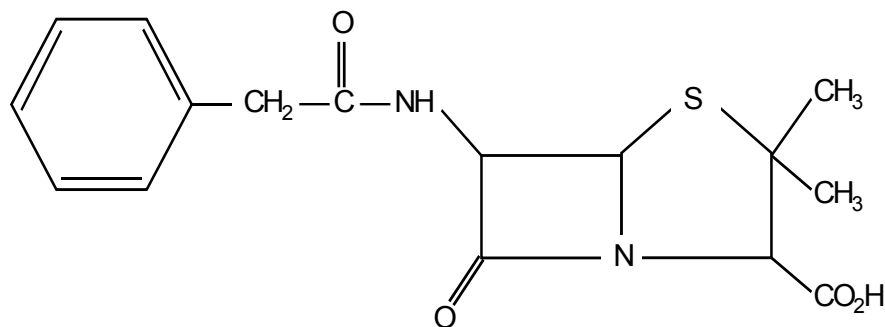
Es wird zur Therapie einer Reihe von Infektionen mit grampositiven Erregern, besonders Streptokokken und Anaerobiern, eingesetzt.

Die Gabe erfolgt i.m. oder i.v., jedoch nicht oral, da Penicillin G nur eine geringe Säurefestigkeit aufweist.

Die Halbwertszeit beträgt 40 Minuten; die Plasmaeiweißbindung 50 %.

Kurzzeichen nach DIN 58940: PEN

Strukturformel:



Quelle: Simon/Stille [109]

3.3.6. VANCOMYCIN (Lilly Pharma)

Die E-Test-Streifen für die Versuchsreihen sind von der Firma Biodisk (Best-Nr.: 51002558).

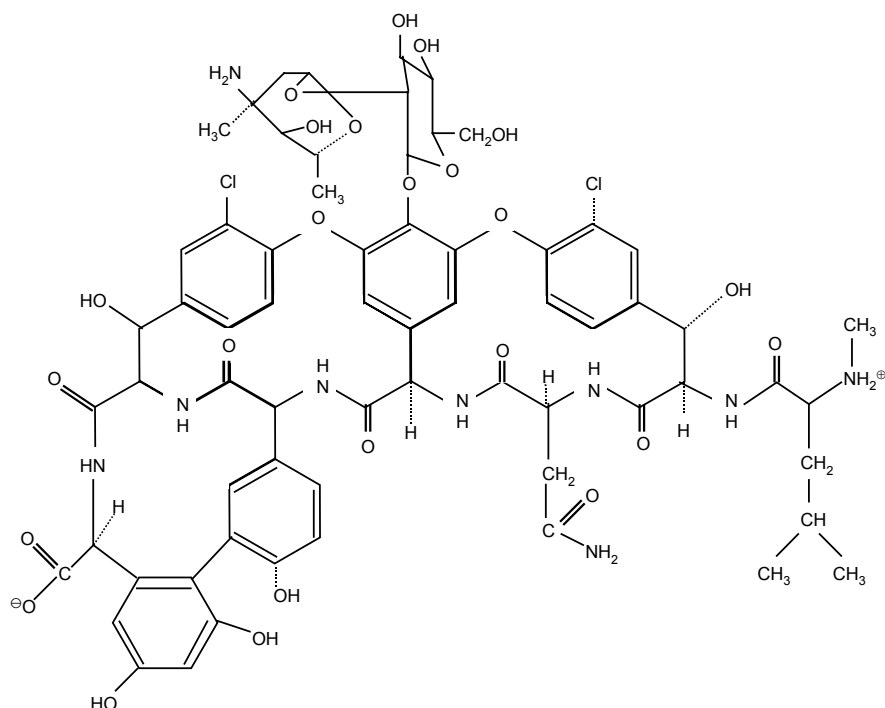
Vancomycin, ein großmolekulares Glycopeptid, hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand und wirkt bakterizid.

Es ist ausschließlich gegen grampositive Erreger wirksam. Vancomycin ist bisher ein zuverlässiges Staphylokokken-Antibiotikum, das auch gegen Oxacillin-resistente Stämme eingesetzt wird.

Die Gabe erfolgt i.v.. Die Halbwertszeit beträgt 6 Stunden; die Plasmaproteinbindung etwa 55 %.

Kurzzeichen nach DIN 58940: VAN

Strukturformel:



4. METHODEN

4.1. BESTIMMUNG DER MINIMALEN HEMMKONZENTRATION UND DER MINIMALEN BAKTERIZIDEN KONZENTRATION

Die minimalen Hemmkonzentrationen werden mittels Makrodilutions-verfahren (5 ml) gemäß DIN 58940-BD bzw. NCCLS M7-A5 bestimmt [NCCLS 86]. Abweichend von der in den Normen vorgegebenen Mueller Hinton Bouillon wird in dieser Studie Isosensitest-Bouillon verwendet. Zur Qualitätskontrolle werden die Kontrollstämme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in die Empfindlichkeitsprüfung einbezogen.

4.1.1. HERSTELLUNG DER VERDÜNNUNG DER PRÜFSUBSTANZEN

20 mg des Wirkstoffs werden in 10 ml aqua destillata gelöst, um eine Ausgangskonzentration von 2 mg/ml zu erhalten. Liegt das Antiinfektivum nicht als Reinsubstanz (100 %) vor, wird die zu lösende Menge wie folgt berechnet:

$$\frac{100}{\text{Reinheit der Substanz in \%}} \times 20 = \text{mg der Substanz zu lösen in 10 ml aqua dest.}$$

6,4 ml dieser Lösung werden nun zu 3,6 ml Isosensitest-Bouillon in ein Reagenzglas gegeben. Anschließend wird noch einmal 1,0 ml hiervon in 9,0 ml Bouillon verdünnt. Von dieser Ausgangslösung mit einer Wirkstoffkonzentration von 128 µg/ml wird die Hälfte (5 ml) abgenommen und zu 5 ml Bouillon hinzugegeben. Man erhält eine Konzentration von 64 µg/ml. Dieser Vorgang wird wiederholt bis eine Verdünnung von 0,06 µg/ml erreicht ist.

4.1.2. HERSTELLUNG DES INOKULUMS

Ausgehend von einer 20 h bis 24 h bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ unter atmosphärischen Bedingungen (für Pneumokokken wird zusätzlich 5 % CO_2 der Luft beigemischt) bebrüteten Reinkultur des Erregers oder Kontrollkeimes werden mindestens jeweils 4 - 5 Kolonien bei Staphylokokken und Enterokokken und etwa 20 Kolonien bei Pneumokokken in je 5 ml Isosensitest-Bouillon überimpft und bei etwa $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ca. 4 Stunden bebrütet. Das Inokulum wird anschließend mit steriler Bouillon auf eine Dichte von 0,5 McFarland eingestellt. Die Überprüfung erfolgt visuell. Es wird damit eine Keimkonzentration von etwa $1 - 5 \times 10^8$ koloniebildenden Einheiten/ml (KBE/ml) erreicht.

4.1.3. INOKULATION

Zu jeder Verdünnungsstufe des Antibiotikums (5 ml) werden 50 μl der Keimsuspension gegeben. Nach wiederum etwa 20 bis 24 Stunden Inkubation bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ erfolgt die Auswertung.

4.1.4. AUSWERTUNG

Als minimale Hemmkonzentration wird die Konzentration angenommen, bei der keinerlei Trübung der Bouillon, also kein Keimwachstum, zu sehen ist. Die minimale bakterizide Konzentration ist als die Konzentration festgelegt, bei der nach Ausstrich von 10 μl Bouillon auf Mueller Hinton Agar bzw. Columbia Blut Agar (für Pneumokokken) und Bebrütung für 18 - 24 Stunden bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (bei Pneumokokken wird zusätzlich 5 % CO_2 der Luft beigemischt) keine koloniebildenden Einheiten (KBE) mehr vorhanden sind. Die entspricht einer Reduktion der Keime um 3 \log_{10} -Stufen.

4.1.5. MHK-BESTIMMUNG FÜR VANCOMYCIN

Die MHK für Vancomycin wird mittels E-Test Streifen (Fa. Biodisk, Best-Nr.: 51002558) bestimmt. Hierzu werden ausgehend von einer 20 h bis 24 h bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ unter atmosphärischen Bedingungen bebrüteten Reinkultur 4 - 5 koloniebildende Einheiten (KBE) des zu untersuchenden Bakterienstammes in physiologische Kochsalzlösung gegeben. Diese wird verdünnt bis 0,5 McFarland erreicht sind. 10 μl dieser Suspension werden auf eine Mueller Hinton Agar Platte aufgebracht und mit einem Glasspatel gleichmäßig verteilt. Anschließend wird der E-Test-Streifen daraufgelegt. Nach etwa 20 bis 24 Stunden Bebrütung bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ wird abgelesen, wie weit der Bakterienrasen an den Streifen herangewachsen ist. Der dort befindliche Wert gibt die minimale Hemmkonzentration an.

4.1.6. WIRKSAMKEITSGRENZWERTE

Die Wirksamkeitsgrenzwerte für Benzylpenicillin sind laut DIN 58940-4 wie folgt festgelegt: Als Penicillin-sensibel gelten Bakterien mit einer MHK $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$, intermediär-empfindlich sind Stämme mit einer MHK von $0,25 - 1,0 \mu\text{g/ml}$ und resistent sind Stämme mit einer MHK $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$.

Gemäß Fachinformation vom Juni 1999 gelten folgende Grenzwerte für Moxifloxacin: Als sensibel sind Bakterien mit einer MHK $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ zu beurteilen und als resistent Bakterien mit einer MHK $\geq 4,0 \mu\text{g/ml}$.

DIN 58940-4 bezeichnet Bakterien-Stämme mit einer MHK $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ als Oxacillin-resistent und $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ als Oxacillin-empfindlich.

Als Cefuroxim-empfindlich werden Keime mit einer MHK $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ laut DIN 58940-4 definiert. Intermediär-empfindlich sind Stämme mit einer MHK von $2,0 - 4,0 \mu\text{g/ml}$ und als Cefuroxim-resistent gelten Stämme mit einer MHK $\geq 8,0 \mu\text{g/ml}$.

Die bei der NCCLS zur Zulassung eingereichten MHK-Werte für Linezolid bezeichnen Bakterien mit einer MHK $\leq 2,0$ $\mu\text{g/ml}$ als Linezolid-empfindlich, als intermediär-empfindlich mit einer MHK von $4,0$ $\mu\text{g/ml}$ und als resistent mit einer MHK $\geq 8,0$ $\mu\text{g/ml}$.

Nach DIN 58940-4 gelten folgende Grenzwerte: Vancomycin-sensibel sind Enterokokken-Stämme mit einer MHK $\leq 4,0$ $\mu\text{g/ml}$, intermediär sind Stämme mit einer MHK von $8,0$ $\mu\text{g/ml}$ und als Vancomycin-resistent sind Enterokokken mit einer MHK $\geq 16,0$ $\mu\text{g/ml}$ zu bezeichnen.

4.2. BESTIMMUNG DER BAKTERIZIDIE-KINETIK

Es wird die Bakterizidiekinetik, d.h. die Absterberate in Relation zur Zeit, von antibakteriellen Wirkstoffen gegen verschiedene Keime untersucht. Aus der daraus abgeleiteten Abtötungskurve lassen sich Rückschlüsse auf die zeit- und/oder konzentrationsabhängige Wirkung eines Antibiotikums ziehen.

Die in der Literatur bereits beschriebene Methode nach Klein, Davies und Shah wird modifiziert [Davies 27, Klein 63, Shah 106] und in Anlehnung an NCCLS M26-A durchgeführt [NCCLS 87].

4.2.1. PRINZIP

Eine in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Keimpopulation wird unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. Anschließend wird in festgelegten Zeitabständen die Lebendkeimzahl bestimmt.

Die Bakterizidie-Kinetik wird für alle hier untersuchten Bakterienspezies in Isosensitest-Bouillon durchgeführt. *S. pneumoniae*-Stämme sind anspruchsvolle Keime, die zum Wachstum Serum oder Blut benötigen [Burkhardt 16]. Um in der vorliegenden Arbeit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Bakterienspezies zu gewährleisten, wird entgegen den Empfehlungen in der Literatur auch für Pneumokokken Isosensitest-Bouillon ohne Zusätze verwendet. Hiermit wird eine Keimvermehrung dieser Bakterienspezies über mindestens 6 Stunden erreicht. Dieser Zeitraum wird als ausreichend zur Interpretation der Ergebnisse angesehen.

4.2.2. WIRKSTOFFVERDÜNNUNG

Zur Ermittlung der zu prüfenden Wirkstoffkonzentrationen wird vor Bestimmung der Abtötungskurve die minimale Hemmkonzentration der zu testenden Antiinfektiva gegenüber der eingesetzten Bakterienstämme wie in Kapitel 4.1. beschrieben untersucht. Daraufhin wird die 0,1-fache, einfache und zehnfache MHK als Testkonzentration festgelegt.

Die Verdünnung der Prüfsubstanz erfolgt grundsätzlich wie bereits in Abschnitt 4.1.1. beschrieben, bis die jeweils zehnfache Testkonzentration erreicht ist.

4.2.3. HERSTELLUNG DES INOKULUMS

Die Herstellung des Inokulums erfolgt wie in Abschnitt 4.1.2. bereits beschrieben. Von der Suspension mit einer Keimkonzentration von etwa $1 - 5 \times 10^8$ KBE/ml werden 50 µl in 5 ml Isosensitest-Bouillon oder Vollblut gegeben. Nach einem kurzen Durchmischen werden 0,5 ml hiervon verworfen.

4.2.4. TESTDURCHFÜHRUNG

Zu den 4,5 ml Keimsuspension werden 0,5 ml der zehnfachen Testkonzentration des zu untersuchenden Wirkstoffs gegeben. Man hat nun drei Ansätze mit 0,1-facher MHK, einfacher MHK und zehnfacher MHK. Ein viertes Röhrchen mit Keimsuspension ohne Antibiotikum dient der Wachstumskontrolle. Alle vier Testansätze werden etwa 24 h bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ im Wasserschüttelbad inkubiert.

Die Lebendkeimzahl der Erreger unter Einwirkung des Antibiotikums wird zum Zeitpunkt Null und anschließend nach 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h bestimmt. Hierzu werden Proben von je 100 µl entnommen, in einer Reihenverdünnung im Verhältnis 1:10 viermal mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. 10 µl jedes Verdünnungsansatzes werden auf Mueller Hinton Agar bzw. Columbia Blut Agar (bei Pneumokokken) subkultiviert.

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird nach wiederum 18 - 24 Stunden Bebrütung bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (bei Pneumokokken wird zusätzlich 5% CO_2 der Luft beigemischt) unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe ermittelt.

4.2.5. AUSWERTUNG

Unter bakterizider Wirkung wird eine Reduktion der KBE um 3 \log_{10} -Stufen verstanden. Bei einer bakteriostatischen Aktivität wird die Vermehrung der Bakterien verhindert.

4.3. DURCHFÜHRUNG DER PHAGOZYTULOSE-VERSUCHE

4.3.1. KURZER RÜCKBLICK AUF DIE METHODENENTWICKLUNG

Um die Aktivität von Moxifloxacin und Linezolid auf intrazelluläre Erreger unter möglichst natürlichen Bedingungen an einem Modell überprüfen zu können, wurden *S. aureus*-, *S. pneumoniae*- und Enterokokken-Stämme in Granulozyten angereichert.

Die hierfür notwendige Isolierung der Granulozyten wird durch Zentrifugieren in einem Percoll™-Dichtegradienten durchgeführt. Die Erstbeschreibung dieses Verfahrens erfolgt 1968 durch Pertoft et al. [Pertoft 93-94]. Arbeitsgruppen aus Frankfurt a.M. entwickeln dieses Verfahren weiter. Christ beschreibt in seiner Dissertation die Zelltrennung und subzelluläre Fraktionierung lymphatischer Zellen [Christ 21]; Hillmann stellt die Präparation von Leukozyten aus peripherem Blut bei hämatologischen Erkrankungen dar [Hillmann 49]. Thomas verbessert durch einen neuen Dichtegradienten (66 % - 90 %) die Ausbeute an Granulozyten und verringerte die Kontamination mit Thrombozyten auf etwa 1/10 [Thomas 113]. Al-Nawas arbeitet bei seinen Versuchsreihen mit einem weiter verbesserten Dichtegradienten (60 % - 70 % - 80 %). Er vergleicht seine Methode mit der bis dahin häufig verwendeten Lysostaphin-Methode und erkennt die Vorteile der Anreicherung der Leukozyten mit dem Percoll™-Dichtegradienten. Hierbei ist eine Beeinflussung der intrazellulären Keime praktisch ausgeschlossen [Al-Nawas 1].

Damit die zu untersuchenden Bakterien von den isolierten Granulozyten phagozytiert werden, erfolgt zunächst die Opsonisierung in gepooltem Serum. Für die anschließende Aufnahme der Bakterien in die Granulozyten wird in der Literatur eine Zeitdauer von 15 – 20 Minuten bei einer Temperatur von 37°C angegeben [v.d.Broeck 14, Pascual 90-91]. Die anschließende Versuchsdauer sollte 5 Stunden nicht überschreiten, da die gefüllten Granulozyten nach 5 Stunden beginnen abzusterben [Paillard 89].

Die Phagozytoseversuche sind in mehrere Arbeitsschritte untergliedert.

4.3.2. ISOLIERUNG DER GRANULOZYTEN

Zur Anreicherung der Granulozyten wird die von Thomas in seiner Dissertation beschriebene Methode angewendet [Thomas 113]. Zunächst wird der Percoll™-Dichtegradient hergestellt. Dazu werden 9 Teile Percoll™-Lösung mit einem Teil 10-fach konzentrierter Hanks-Salzlösung (10xHanks) gemischt. Dies ist die Stammlösung (100 %), die anschließend mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) so verdünnt wird, dass 60 %, 70 % und 80 %ige Percoll-Lösungen entstehen. In einem Zentrifugenröhrchen werden je 5 ml der Percoll-Verdünnungen ihrer Konzentration entsprechend vorsichtig übereinander geschichtet (80 % - 70 % - 60 %). Darauf werden 5 ml heparinisiertes Venenblut gesunder Männer im Alter bis zu 40 Jahren pipettiert. Es erfolgt eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 500 RZB. Die Granulozyten reichern sich aufgrund ihrer Dichte zwischen der 70 % und 80 %igen Lösung an. Diese Schicht wird vorsichtig abgesaugt, in ein frisches Zentrifugenglas gegeben und mit DPBS aufgefüllt.

Anschließend erfolgt eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 500 RZB, die dem Auswaschen der Percoll™-Lösung dient. Die Granulozyten bilden den Bodensatz, so dass die nicht mehr benötigte Percoll™-Lösung abgenommen und verworfen werden kann. Die Schicht, in der sich die Granulozyten befinden, wird in 3 ml Zellmedium M 199 Earle 1x pipettiert.

4.3.3. BESTIMMUNG DER GRANULOZYTENZAHL

0,1 ml der Zellsuspension werden im Verhältnis 1:10 mit Türks-Lösung verdünnt. Die Zellen werden auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Fläche der Zählkammer wird die Gesamtzahl berechnet. Im allgemeinen werden bei der beschriebenen Methode etwa 10^6 Granulozyten/ml Nährlösung erhalten.

4.3.4. HERSTELLUNG DER BAKTERIENKULTUR

Die Herstellung der Bakterienkultur erfolgt wie in Abschnitt 4.1.2. bereits beschrieben. Die dabei entstandene Bakteriensuspension von ca. $1 - 5 \times 10^8$ KBE/ml wird 1:10 verdünnt, um eine Konzentration von ca. 10^7 KBE/ml zu erhalten.

4.3.5. OPSONISIERUNG

Zu 1 ml dieser Bakteriensuspension werden 10 µl gepooltes Serum gegeben. Anschließend wird das Gemisch für 15 Minuten im Wasserschüttelbad bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Hierbei werden die Bakterien opsonisiert. Opsonine (z.B. Antikörper, Faktoren des Komplementsystems, Fibronectin, usw.) lagern sich dabei an die Bakterien, an. Dadurch wird die Aufnahme der Erreger durch professionelle Phagozyten wie beispielsweise Granulozyten begünstigt.

4.3.6. PHAGOZYTOSE

Zu der Bakteriensuspension werden 3 ml Granulozytensuspension gegeben. Das Gemisch wird für 15 Minuten bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ im Wasserschüttelbad inkubiert.

4.3.7. ISOLIERUNG DER GRANULOZYTEN NACH AUFNAHME VON BAKTERIEN

Um die schweren, mit Bakterien gefüllten Granulozyten von den leichten, leeren zu trennen, werden 5 ml der 60 %igen Stammlösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Bakterien-Granulozyten-Suspension wird vorsichtig darübergeschichtet. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 500 RZB bilden die schweren Granulozyten den Bodensatz und werden in 4 ml Medium 199 übertragen.

4.3.8. ZUGABE DES ANTIINFEKTIVUMS

Zu jeweils 1 ml der Granulozytensuspension werden je die zehnfache MHK, einfache MHK und 0,1-fache MHK des Antibiotikums hinzugegeben (siehe 4.1.1.). Der vierte ml verbleibt für die Wachstumskontrolle der Keime.

Zum Zeitpunkt Null und in stündlichen Intervallen werden aus jedem Ansatz je 100 µl entnommen. Diese Proben werden in einer Reihenverdünnung im Verhältnis 1:10 viermal in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Je 10 µl jeder Verdünnungsstufe werden auf Mueller Hinton Agar bzw. Columbia Blut Agar (bei Pneumokokken) subkultiviert. Nach 18 - 24 Stunden Bebrütung bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (bei Pneumokokken wird zusätzlich 5 % CO_2 der Luft beigemischt) ermittelt man die Anzahl der koloniebildenden Einheiten unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen.

4.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Datenauswertung und die Erstellung der Grafiken erfolgt auf den Rechnern des lokalen Rechnernetzwerks der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programmpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993). Die grafischen Abbildungen werden mit dem Programm PlotIT für Windows, Version 3.20h (Eisensmith, 1994) erzeugt.

Die Versuchsreihen werden insgesamt drei- bis viermal durchgeführt. Da es sich bei den Ergebnissen um eine rechtsschiefe Verteilung positiver quantitativer Merkmale handelt, wird eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (\bar{x}_g) und Streufaktoren (SF), dargestellt in Intervallen $[\bar{x}_g/\text{SF}; \bar{x}_g \cdot \text{SF}]$, vorgenommen.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses auf Signifikanz (p) wird eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wird ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ werden als statistisch signifikant angegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1. MHK UND MBK

Zunächst werden die Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und Minimalen Bakteriziden Konzentrationen (MBK) der Antiinfektiva für die verschiedenen in dieser Studie betrachteten Bakterienstämme dargestellt.

5.1.1. PNEUMOKOKKEN

Tabelle 5.1.1. MHK- und MBK-Werte der untersuchten Pneumokokken-Stämme gegenüber verschiedenen Antibiotika

	Penicillin G (µg/ml)		Moxifloxacin (µg/ml)	
	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>S. pneumoniae</i> 40 S	0,015	0,015	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 50 S	0,015	0,015	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 61 S	0,015	0,015	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 62 S	0,015	0,015	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 13 R	2,0	2,0	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 21 R	2,0	2,0	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 53 R	2,0	2,0	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> 56 R	2,0	2,0	0,25	0,5

Trotz der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegen Benzylpenicillin ist die Aktivität von Moxifloxacin gegen alle Pneumokokken gleich. Die untersuchten Stämme haben einen MHK-Wert von 0,25 µg/ml und einen MBK-Wert von 0,5 µg/ml.

5.1.2.STAPHYLOKOKKEN

Tabelle 5.1.2. MHK-Werte der untersuchten Staphylokokken-Stämmen gegenüber verschiedenen Antiinfektiva

	Penicillin G (µg/ml)	Oxacillin (µg/ml)	Cefuroxi m (µg/ml)	Moxifloxaci n (µg/ml)	Linezoli d (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,03	0,25	0,5	0,06	2,0
MRSA Norddeutsch	> 128	> 128	> 128	4,0	2,0
<i>S. aureus</i> 1538/00	0,5	0,25	1,0	0,06	2,0
<i>S. aureus</i> 2394/00	4,0	0,25	1,0	0,06	2,0

Der Qualitätskontrollstamm sowie *S. aureus* 1538/00 sind sensibel gegenüber allen untersuchten Antiinfektiva. Der MRSA-Stamm ist resistent gegen β -Lactam-Antibiotika. Der MHK-Wert für Moxifloxacin zeigt eine stark verminderte Empfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin. Nur für Linezolid ist *S. aureus* MRSA sensibel. *S. aureus* 2394/00 ist Penicillin-resistent. Gegenüber den anderen vier untersuchten Antiinfektiva ist der Stamm sensibel.

5.1.3. ENTEROKOKKEN

Tabelle 5.1.3. MHK-Werte der untersuchten Enterokokken-Stämme gegenüber verschiedenen Antibiotika

	Moxifloxacin (µg/ml)	Linezolid (µg/ml)	Vancomycin (µg/ml)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,25	2,0	2,0
<i>E. faecalis</i> VS 83	0,25	2,0	8,0
<i>E. faecium</i> BM 4147	2,0	4,0	> 256
<i>E. faecium</i> 14758/99	2,0	1,0	1,0

Der Qualitätskontrollstamm ist sensibel für alle untersuchten Antiinfektiva. *E. faecalis* VS 83 zeigt eine Resistenz gegen Vancomycin. Intermediär-empfindlich ist *E. faecium* BM 4147 gegen Moxifloxacin und Linezolid. Der Stamm ist Vancomycin-resistent. *E. faecium* 14758/99 ist intermediär-empfindlich für Moxifloxacin. Der Stamm ist Linezolid- sowie Vancomycin-sensibel.

5.2. BAKTERIZIDIE-KINETIK

5.2.1. PENICILLIN G

5.2.1.1. Penicillin-sensible *Streptococcus pneumoniae*

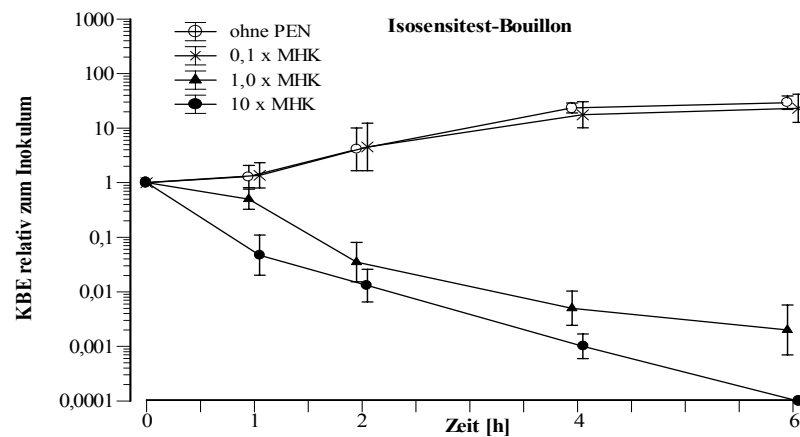


Abb. 5.2.1.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Penicillin G gegenüber Penicillin-sensiblen *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=0,015 µg/ml)

Ohne Penicillin G bzw. mit der einfachen MHK ist Bakterienvermehrung zu erkennen. Da Isosensitest-Bouillon für Pneumokokken kein optimales Nährmedium darstellt, beginnen die Keime nach ca. 6 - 8 Stunden wieder abzusterben.

Bei Zugabe der einfachen MHK Penicillin G erfolgt eine Reduktion der Einsaat um mehr als 99,0 %, bei der zehnfachen MHK um mehr als 99,9 % innerhalb der ersten sechs Stunden.

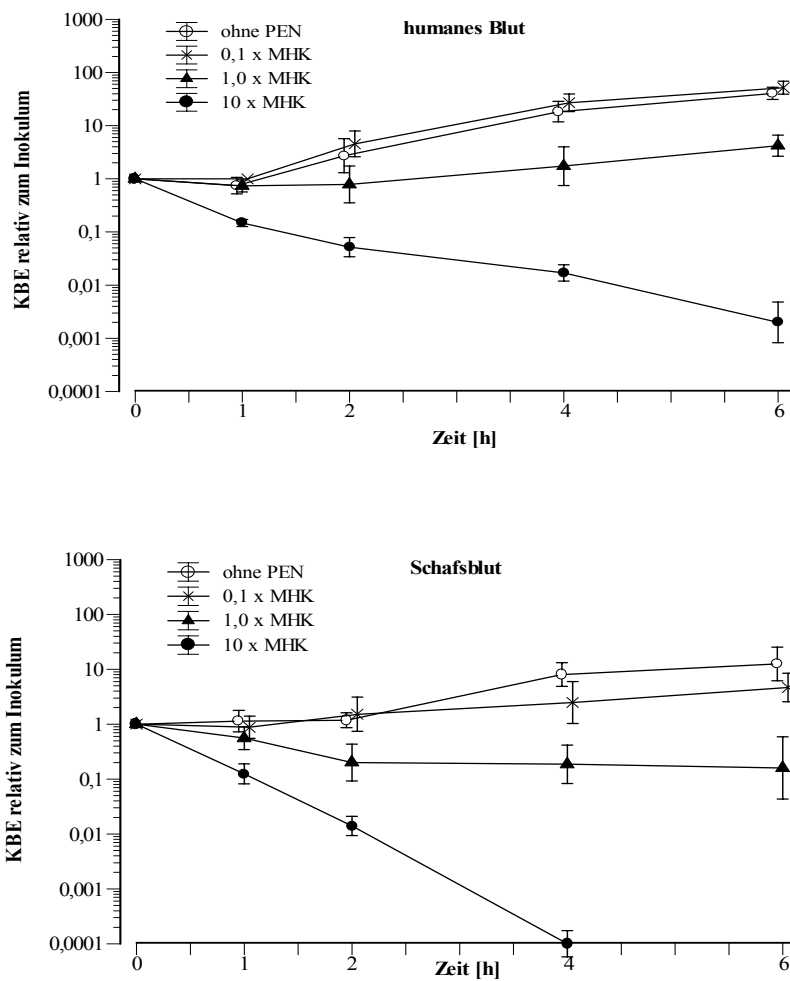


Abb. 5.2.1.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Penicillin G gegenüber Penicillin-sensiblen *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Blut und Schafsblut (MHK=0,015 µg/ml)

In humanem Blut ist ein deutlicher Aktivitätsverlust von Penicillin G zu erkennen. Die einfache MHK führt zu keiner Reduktion des Inokulums. Die zehnfache MHK tötet innerhalb der ersten 6 Stunden 99,7 % der Keime ab.

In Schafsblut hat die einfache MHK eine bakteriostatische Wirkung, die zehnfache MHK führt zur Abtötung der Keime nach 4 Stunden.

5.2.1.2. Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae*

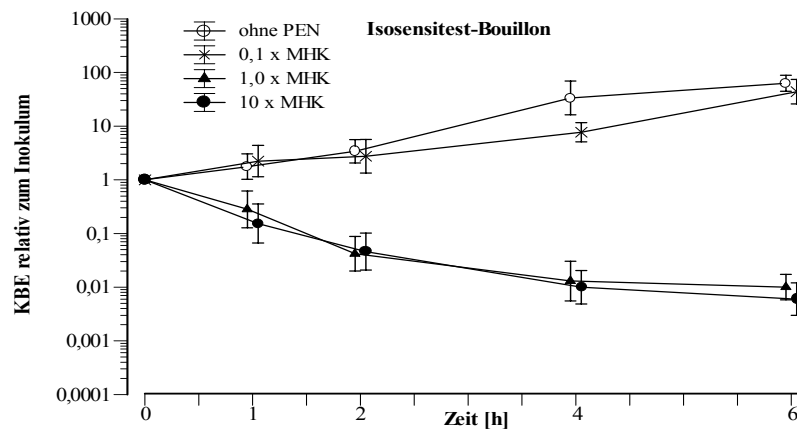


Abb. 5.2.1.2.1. Bakterizidie-Kinetik von Penicillin G gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=2,0 µg/ml)

Die Aktivität von Penicillin G gegenüber Penicillin-resistenten Pneumokokken in Bouillon ist ähnlich der gegenüber Penicillin-sensiblen Stämmen. Jedoch erreicht die zehnfache MHK nur eine Reduktion der Einsaat von ca. 99,0 %. Über einen Zeitraum von länger als 6 Stunden ist ein Wiederauswachsen der Keime zu erkennen.

Insgesamt kommt es aufgrund der ungünstigen Eigenschaften von Isosensitest-Bouillon für Pneumokokken nach ca. 8 Stunden zu einem Absterben der Bakterien.

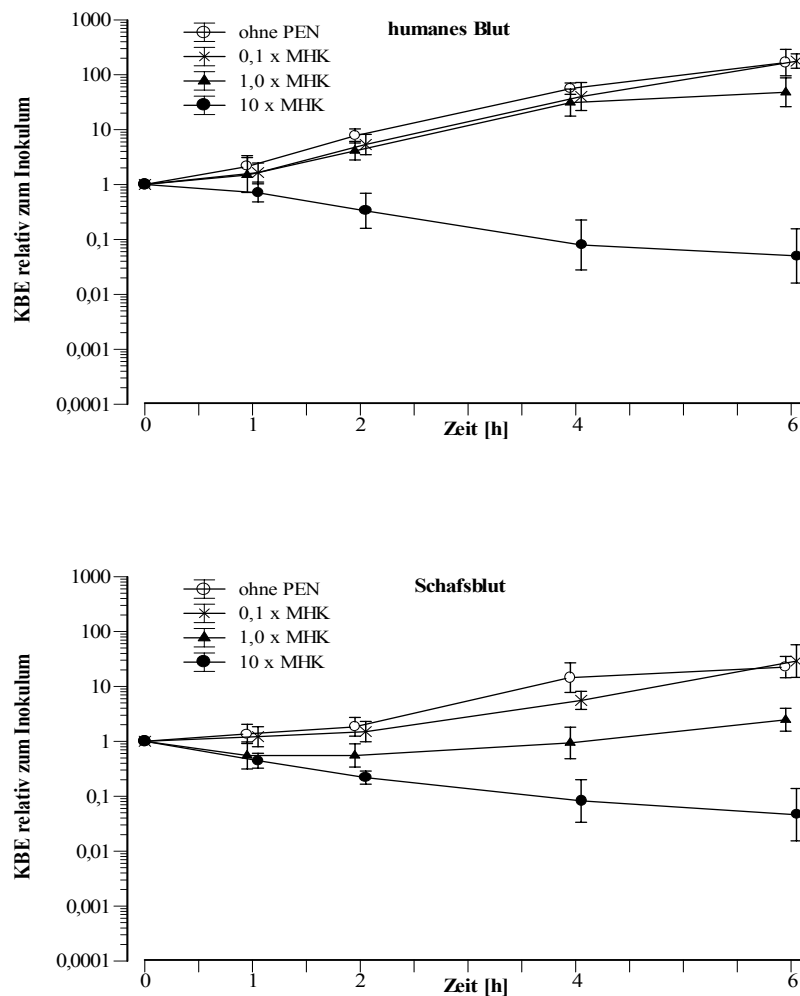


Abb. 5.2.1.2.2. Bakterizidie-Kinetik von Penicillin G gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Blut und Schafsblut (MHK=2,0 µg/ml)

Bei Penicillin-resistenten Pneumokokken ist der Aktivitätsverlust in Blut im Vergleich zu Bouillon von Penicillin G erheblich. Die zehnfache MHK führt sowohl in humanem Blut wie auch in Schafsblut zu einer Reduktion des Inokulums um nur etwa eine log₁₀-Stufe.

Es erfolgt eine Gegenüberstellung der benötigten Zeiten zur Reduktion der Einsaaten in den verschiedenen getesteten Medien.

Tab. 5.2.1.1. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Penicillin G zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon, in humanem Blut und in Schafsblut

<i>S. pneumoniae</i> -Stamm	MHK (µg/ml)	PEN in Bouillon		PEN in humanem Blut		PEN in Schafsblut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. pneumoniae</i> 40 S	0,015	3 h	3 h	n.e.	5 h	n.e.	3 h
<i>S. pneumoniae</i> 50 S	0,015	1,5 h	3 h	n.e.	5 h	n.e.	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 61 S	0,015	3 h	3 h	n.e.	5 h	n.e.	3 h
<i>S. pneumoniae</i> 62 S	0,015	n.e.	1,5 h	n.e.	3 h	2 h	3 h
<i>S. pneumoniae</i> 13 R	2,0	5 h	1,5 h	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>S. pneumoniae</i> 21 R	2,0	5 h	5 h	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>S. pneumoniae</i> 53 R	2,0	3 h, w.g.	3 h	5 h, w.g.	3 h	6 h, w.g.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 56 R	2,0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	20 h

S=Penicillin-sensibel, R=Penicillin-resistent, n.e.= nicht erreicht, w.g.= wieder gewachsen

Mit der 0,1-fachen MHK wird in keinem der untersuchten Medien eine Reduktion der Einsaat um 99,0 % erreicht.

Bei Zugabe der einfachen MHK Penicillin G wird in Isosensitest-Bouillon bei 3 von 4 Penicillin-sensiblen Stämmen und bei 3 von 4 Penicillin-resistenten Stämmen, wobei *S. pneumoniae* 53 R anschließend wieder ausgewachsen ist, eine Abtötung von 99,0 % erreicht. In humanem Blut werden die KBE des Stammes 53 R um 99,0 % reduziert, vermehren sich dann aber wieder. In Schafsblut werden bei mit der einfachen MHK zwei Bakterienstämme um 99,0 % abgetötet, wovon einer wieder auswächst.

Bei Verwendung der zehnfachen MHK wird in Bouillon bei 7 von 8 Stämmen eine Reduktion des Inokulums um 99,0 % erreicht. In humanem Blut werden alle Penicillin-sensiblen und einer von vier Penicillin-resistenten Stämmen um 99,0 % abgetötet; in Schafsblut sind es alle Penicillin-sensiblen und zwei von vier Penicillin-resistente Stämme.

Es ist in Blut ein Aktivitätsverlust von Penicillin G zu erkennen. Es kommt selbst bei der zehnfachen MHK nicht immer zu einer Reduktion der Einsaat um 99,0 %.

Tab. 5.2.1.2. Durchschnittlich benötigte Zeit von Penicillin G zur Reduktion des Inokulums um 99,9 % in Isosensitest-Bouillon, in humanem Blut und in Schafsblut

<i>S. pneumoniae</i> -Stamm	MHK (µg/ml)	PEN in Bouillon		PEN in humanem Blut		PEN in Schafsblut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. pneumoniae</i> 40 S	0,015	5 h	6 h	n.e.	20 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 50 S	0,015	4 h	5 h	n.e.	10 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 61 S	0,015	5 h	5 h	n.e.	5 h	n.e.	5 h
<i>S. pneumoniae</i> 62 S	0,015	n.e.	3 h	n.e.	6 h	4 h	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 13 R	2,0	6 h	3 h	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>S. pneumoniae</i> 21 R	2,0	n.e.	6 h	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>S. pneumoniae</i> 53 R	2,0	5 h, w.g.	5 h	n.e.	5 h	n.e.	5 h, w.g.
<i>S. pneumoniae</i> 56 R	2,0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

S=Penicillin-sensibel, R=Penicillin-resistent, n.e.= nicht erreicht, w.g.= wieder gewachsen

Die Reduktion des Inokulums um 99,9 % wird mit der einfachen MHK nicht immer erreicht. In Bouillon geschieht dies bei drei von vier Penicillin-sensiblen und bei einem von vier Penicillin-resistenten Stämmen. In humanem Blut erfolgt mit der einfachen MHK keine Reduktion der Einsaat um 99,9 % und in Schafsblut wird nur ein Penicillin-sensibler Stamm abgetötet.

Mit der zehnfachen MHK Penicillin G werden sieben von acht Stämmen in Bouillon abgetötet. Sowohl in humanem Blut wie auch in Schafsblut werden die Inokula aller Penicillin-sensiblen Stämme um 99,9 % reduziert. Von den getesteten Penicillin-resistenten Pneumokokken wird bei je nur drei von vier Stämmen eine Keimreduktion von 99,9 % erreicht, wobei der 53 R-Stamm in Schafsblut anschließend wieder auswächst.

Insgesamt ist ein Aktivitätsverlust von Penicillin G in Blut im Vergleich zu Bouillon zu erkennen.

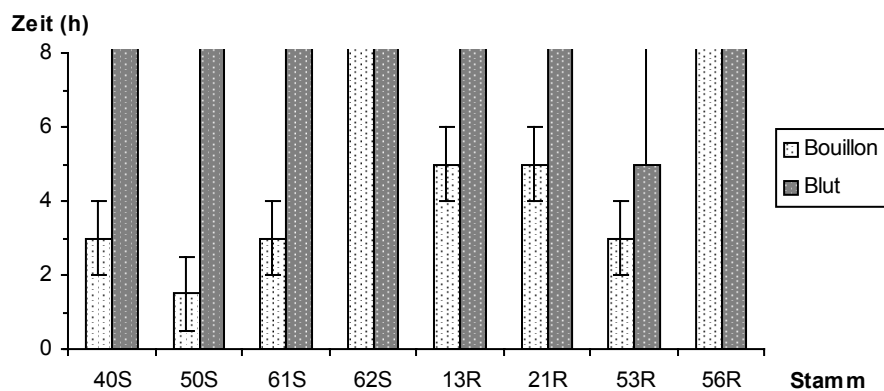


Abb. 5.2.1.1. Benötigte Zeit zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut bei Verwendung von 1,0 x MHK Penicillin G

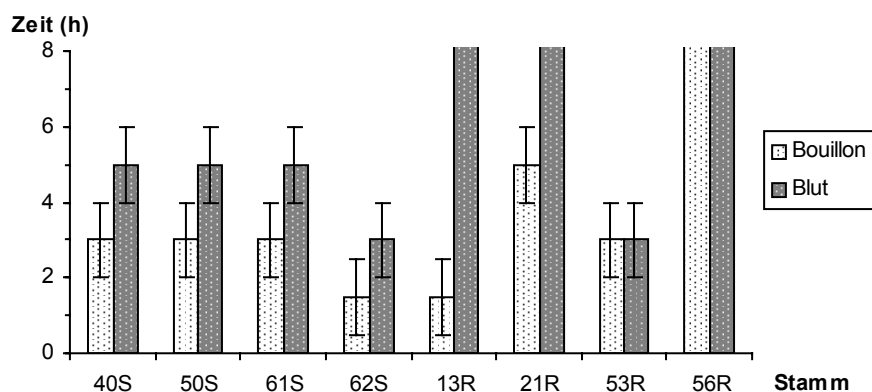


Abb. 5.2.1.2. Benötigte Zeit zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut bei Verwendung von 10 x MHK Penicillin G

Beide Säulendiagramme der Abb. 5.2.1.1. und 5.2.1.2. zeigen, dass die Aktivität von Penicillin G in humanem Blut geringer ist als in Bouillon. Es wird sowohl bei der einfachen MHK wie auch bei der zehnfachen MHK mehr Zeit benötigt zur Reduktion des Inokulums um 99,0 %.

5.2.2. MOXIFLOXACIN

5.2.4.1. Penicillin-sensible *Streptococcus pneumoniae*

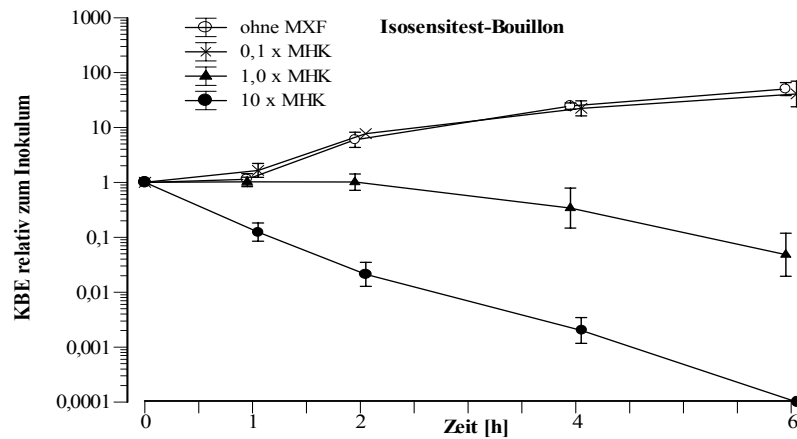


Abb. 5.2.2.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber Penicillin-sensiblen *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=0,25 µg/ml)

Eine Wirkung wird erst ab der einfachen MHK erzielt. Hierbei kommt es zur Hemmung des Bakterienwachstums. Die Abtötung der Pneumokokken wird mit der zehnfachen MHK innerhalb von 5 Stunden erreicht.

Da Isosensitest-Bouillon für Pneumokokken kein optimales Medium darstellt, beginnen die Keime nach 6 - 8 Stunden wieder abzusterben.

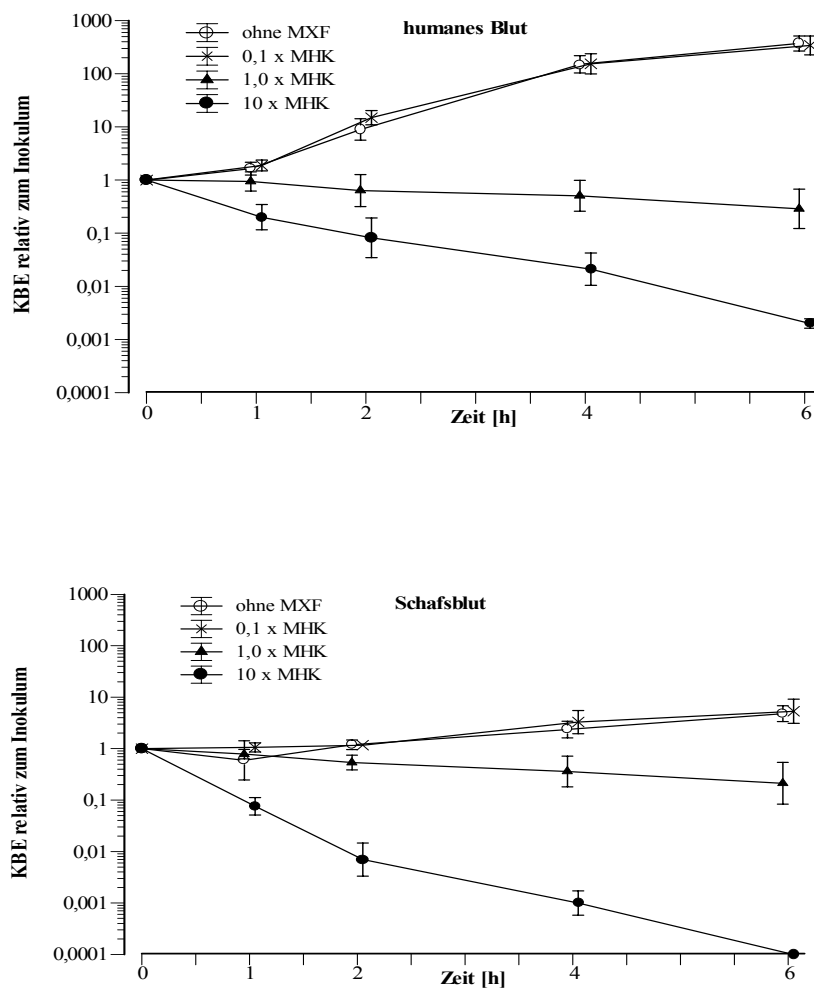


Abb. 5.2.2.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber Penicillin-sensiblen *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Blut und Schafsblut (MHK=0,25 µg/ml)

Gegen Penicillin-sensible Pneumokokken tritt ein Aktivitätsverlust von Moxifloxacin in humanem Blut auf. Hier kommt es erst nach 6 Stunden zu einer Reduktion der Einsaat um 99,8 %.

In Schafsblut ist bei Verwendung der zehnfachen MHK Moxifloxacin kein Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Die Abtötung erfolgt ebenso schnell wie in Bouillon.

5.2.4.2. Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae*

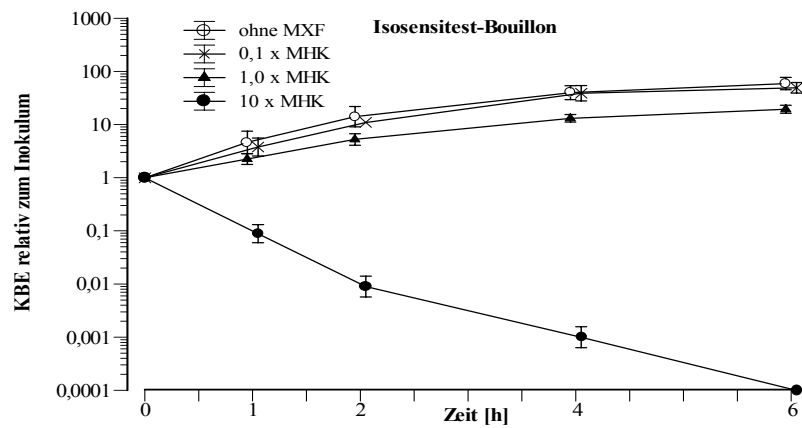


Abb. 5.2.2.2.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=0,25 µg/ml)

Eine Keimreduktion wird erst mit der zehnfachen MHK von Moxifloxacin erreicht. Hier kommt es zur Abtötung der Keime um fast 4 log₁₀-Stufen innerhalb von 4,5 Stunden.

Da Isosensitest-Bouillon kein optimales Medium für Pneumokokken darstellt, ist auch hier über einen Zeitraum, der mehr als 8 Stunden beträgt, ein Absterben der Keime festzustellen.

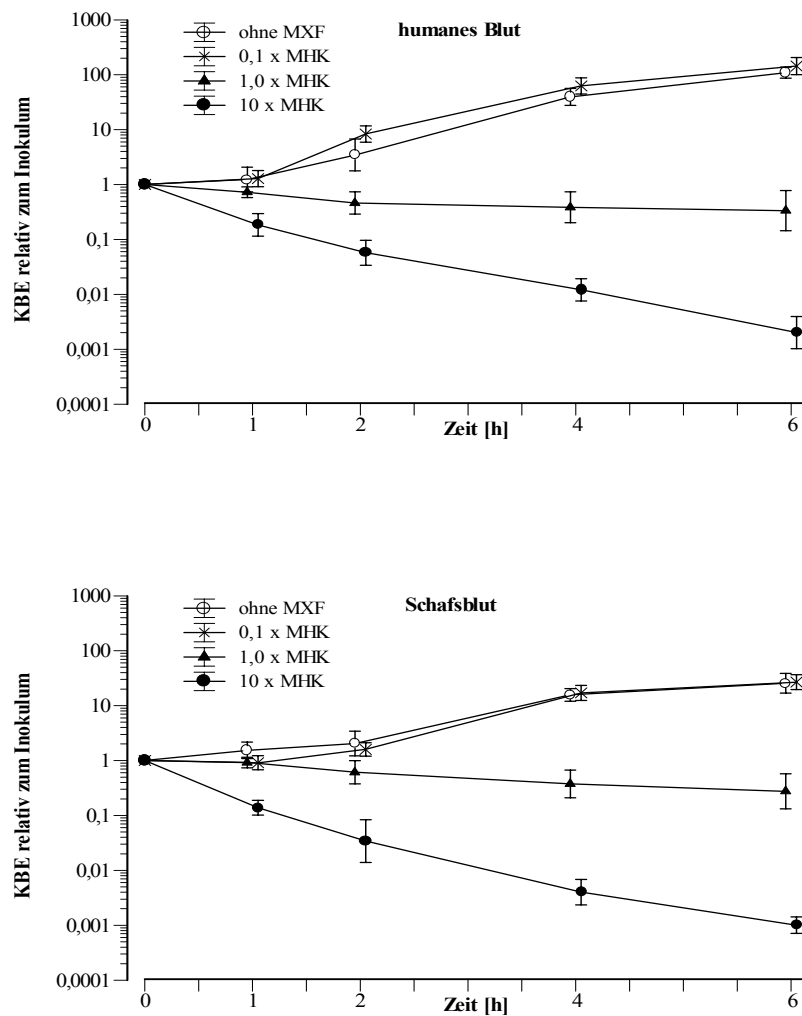


Abb. 5.2.2.2.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Blut und Schafsblut (MHK=0,25 µg/ml)

Die zehnfache MHK Moxifloxacin hat sowohl in humanem- wie auch in Schafsblut gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* einen deutlichen Aktivitätsverlust im Vergleich zu Isosensitest-Bouillon. Bei der zehnfachen MHK wird über einen Zeitraum von 6 Stunden (humanem Blut) eine Keimreduktion von maximal 99,7 % erreicht. Dies ist deutlich weniger und langsamer als in Bouillon.

Tab. 5.2.2.1. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon, in humanem Blut und in Schafsblut

<i>S. pneumoniae</i> -Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut		MXF in Schafsblut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. pneumoniae</i> 40 S	0,25	n.e.	3 h	n.e.	5 h	n.e.	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 50 S	0,25	n.e.	3 h	n.e.	3 h	n.e.	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 61 S	0,25	n.e.	1,5 h	20 h	4 h	20 h	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 62 S	0,25	n.e.	0,5 h	6 h	5 h	n.e.	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 13 R	0,25	n.e.	1,5 h	n.e.	5 h	n.e.	3 h
<i>S. pneumoniae</i> 21 R	0,25	n.e.	3 h	n.e.	5 h	n.e.	5 h
<i>S. pneumoniae</i> 53 R	0,25	n.e.	1 h	n.e.	1,5 h	20 h	1 h
<i>S. pneumoniae</i> 56 R	0,25	n.e.	1 h	5 h	1,5 h	5 h	1,5 h

S=Penicillin-sensibel, R=Penicillin-resistent, n.e.= nicht erreicht

Bei Zugabe der einfachen MHK Moxifloxacin wird in Bouillon keine Reduktion der Einsaat um 99,0% erreicht. In humanem Blut und in Schafsblut wird bei 3 von 8 Stämmen eine Abtötung von 99,0 % erzielt. Mit der zehnfachen MHK werden die Inokula aller untersuchten Stämme um 99,0 % reduziert. In Isosensitest-Bouillon geschieht dies innerhalb von 0,5 bis 3 Stunden. In humanem Blut werden dazu bis zu 5 Stunden benötigt. In Schafsblut werden bei 7 von 8 Stämmen die Pneumokokken innerhalb von 3 Stunden um 99,0 % reduziert. Bei *S. pneumoniae* 21 R erfordert die Erreichung dieses Wertes 5 Stunden. Moxifloxacin hat in Blut einen Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Im Vergleich zu Penicillin G wirkt es jedoch besser gegen Penicillin-resistente Pneumokokken, besonders in humanem bzw. ovinem Blut.

Tab. 5.2.2.2. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,9 % in Isosensitest-Bouillon, in humanem Blut und in Schafsblut

<i>S. pneumoniae</i> -Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut		MXF in Schafsblut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. pneumoniae</i> 40 S	0,25	n.e.	5 h	n.e.	10 h	n.e.	6 h
<i>S. pneumoniae</i> 50 S	0,25	n.e.	4 h	n.e.	2 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 61 S	0,25	n.e.	1,5 h	n.e.	10 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 62 S	0,25	n.e.	1,5 h	n.e.	10 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 13 R	0,25	n.e.	4 h	n.e.	20 h	n.e.	4 h
<i>S. pneumoniae</i> 21 R	0,25	n.e.	6 h	n.e.	10 h	n.e.	8 h
<i>S. pneumoniae</i> 53 R	0,25	n.e.	1 h	n.e.	2 h	20 h	2 h
<i>S. pneumoniae</i> 56 R	0,25	n.e.	2 h	6 h	4 h	10 h	5 h

S=Penicillin-sensibel, R=Penicillin-resistent, n.e.= nicht erreicht

Mit der einfachen MHK Moxifloxacin kommt es in Bouillon zu keiner, in humanem Blut bei einem von acht Stämmen und in Schafsblut bei zwei von acht Stämmen zur Reduktion des Inokulums um 99,9 %. Bei der zehnfachen MHK benötigt Moxifloxacin in Bouillon ca. 4 - 5 Stunden, in humanem Blut etwa 10 Stunden und in Schafsblut bis zu 8 Stunden zur Abtötung von 99,9 % der Einsaat. In Blut ist bei Moxifloxacin ein Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Zur Reduktion der Einsaat um 99,9 % wird im Durchschnitt mehr als die doppelte Zeit benötigt im Vergleich zu Bouillon.

Moxifloxacin wirkt in therapeutisch erreichbaren Dosen (2,5 µg/ml) auf Penicillin-resistente Pneumokokken besser und schneller als Penicillin G (Abb. 5.2.1.1. und 5.2.1.2.). Es wird bei allen getesteten Stämmen eine Reduktion der Einsaat um 99,9 % in ca. 10 Stunden erzielt, während Penicillin G in zehnfacher MHK nur einen von vier getesteten Penicillin-resistenten Pneumokokken-Stämmen um 99,0 % abtötet.

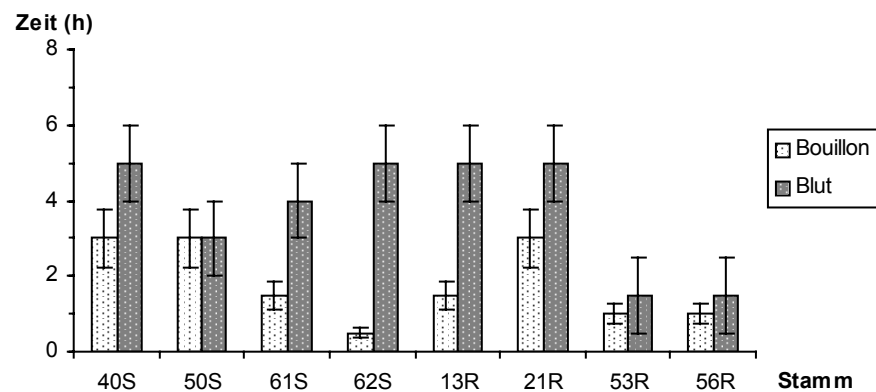


Abb. 5.2.2.1. Benötigte Zeit zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut bei Verwendung von 10 x MHK Moxifloxacin

Bei obigen Säulendiagramm sieht man, dass die Zeit zur Reduktion der Einsaat um 99,0 % in Blut im Vergleich zu Isosensitest-Bouillon verlängert ist.

Da bei der einfachen MHK die Aktivität auch in Bouillon nur unzureichend ist, wird auf diese Darstellung verzichtet.

Gegen die vier getesteten Penicillin-resistenten *S. pneumoniae*-Stämme ist Moxifloxacin in therapeutisch erreichbaren Dosierungen besser und schneller wirksam als Penicillin G. Bei drei von vier getesteten Stämmen wird eine Reduktion der Einsaat in Blut um 99,9 % innerhalb von etwa 10 Stunden erzielt, während Penicillin G in zehnfacher MHK nur einen von vier getesteten Penicillin-resistenten Pneumokokken-Stämmen um 99,0 % abtötet.

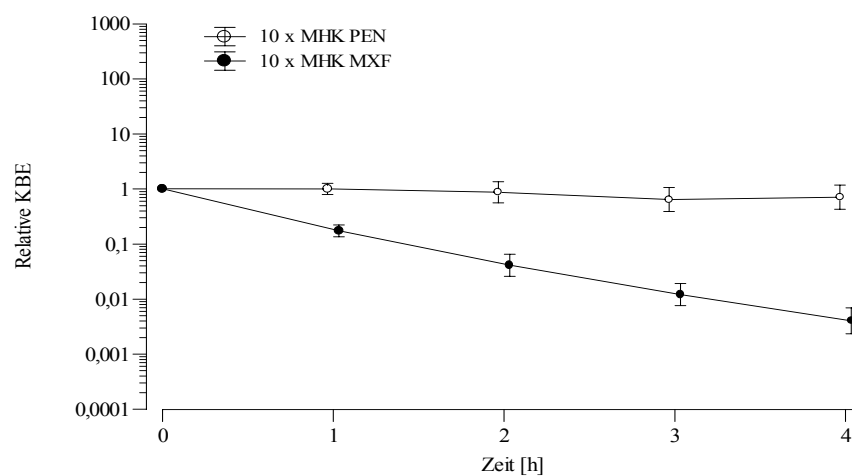


Abb. 5.2.2.2.

Bakterizidie-Kinetik von 10xMHK Penicillin G (MHK=2,0 µg/ml) im Vergleich zu 10xMHK Moxifloxacin (MHK=0,25µg/ml) gegenüber Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Blut

5.2.4.3. *Staphylococcus aureus*

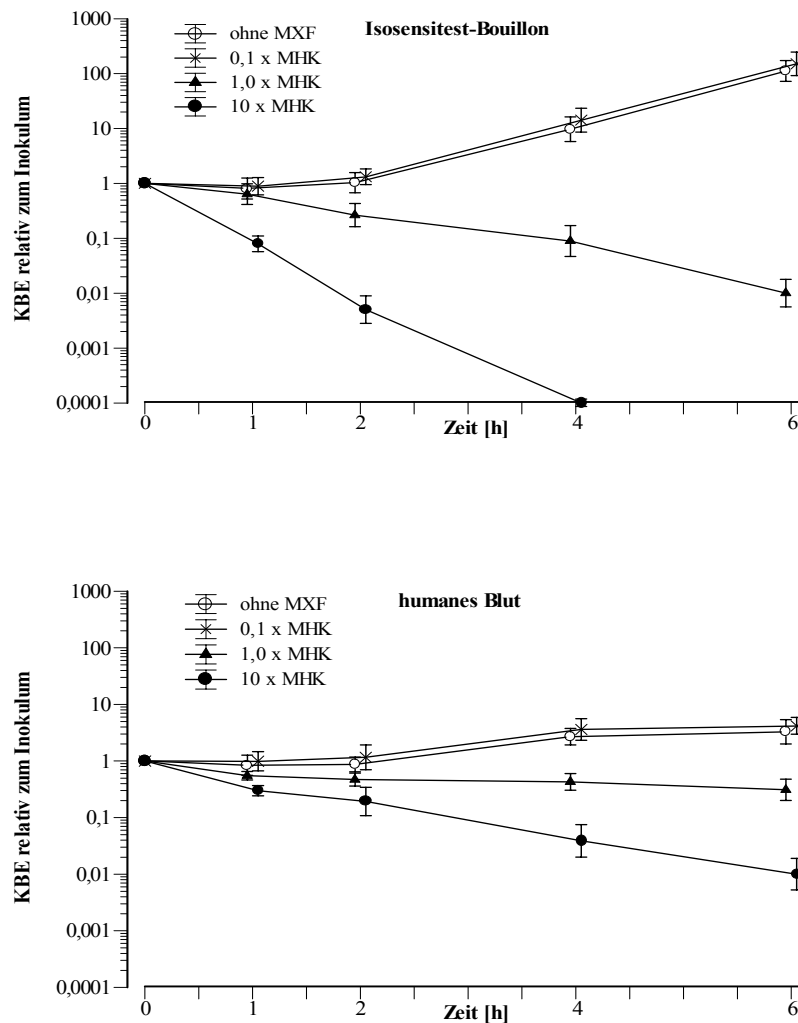


Abb. 5.2.2.3.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,06 µg/ml)

Moxifloxacin hat gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 in Blut einen deutlichen Aktivitätsverlust im Vergleich zu Bouillon. Mit der einfachen MHK kommt es in Bouillon zu einer Reduktion der Einsaat um ca. 99,0 % innerhalb der ersten acht Stunden; in humanem Blut wird lediglich die Bakterienvermehrung gehemmt. Mit der zehnfachen MHK sind in Bouillon die Keime nach spätestens 4 Stunden abgetötet. In Blut wird nur eine Reduktion der Einsaat um etwa 95,0 % nach 8 Stunden erreicht.

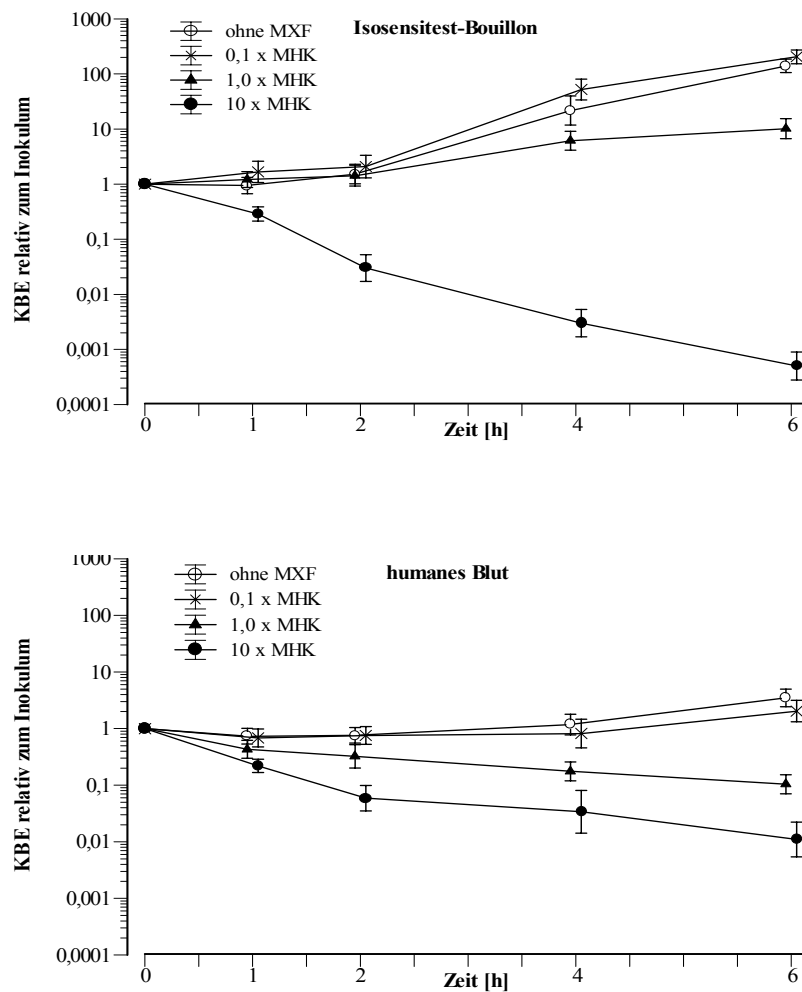


Abb. 5.2.2.3.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,06 µg/ml)

Die einfache MHK wirkt sowohl in Bouillon wie auch in Blut nur bakteriostatisch. Mit der zehnfachen MHK ist gegen *S. aureus* 1538/00 ein Aktivitätsverlust von Moxifloxacin in Blut zu verzeichnen. Hier werden nur 98,0 % der Einsaat abgetötet. In Isosensitest-Bouillon beträgt die Reduktion der Keime mehr als 3 log₁₀-Stufen.

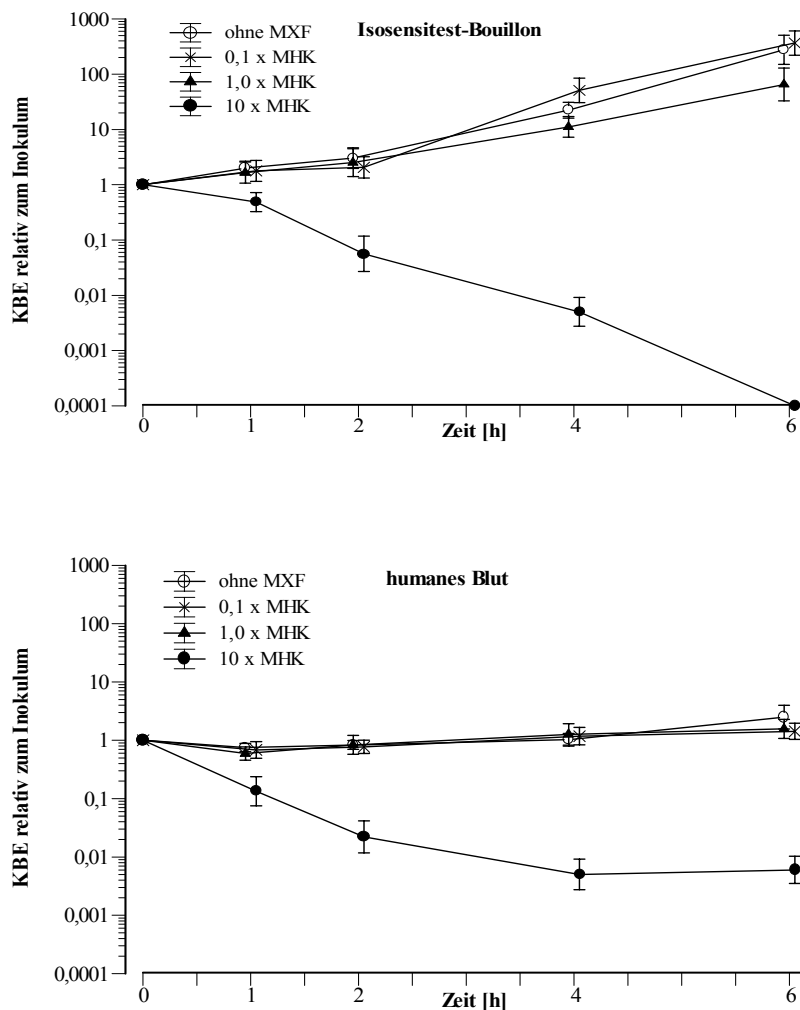


Abb. 5.2.2.3.3. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,06 µg/ml)

Versuchsreihen mit *S. aureus* 2394/00 bestätigen die bisherigen Ergebnisse mit anderen *S. aureus* - Stämmen. Moxifloxacin zeigt in humanem Blut einen Aktivitätsverlust. Mit der zehnfachen MHK kommt es in Blut zu einer Keimreduktion von ca. 99,0 % nach 4 Stunden und anschließendem Wiederauswachsen der Bakterien, während in Bouillon nach ca. 5 Stunden bereits ein bakterizider Effekt erreicht ist.

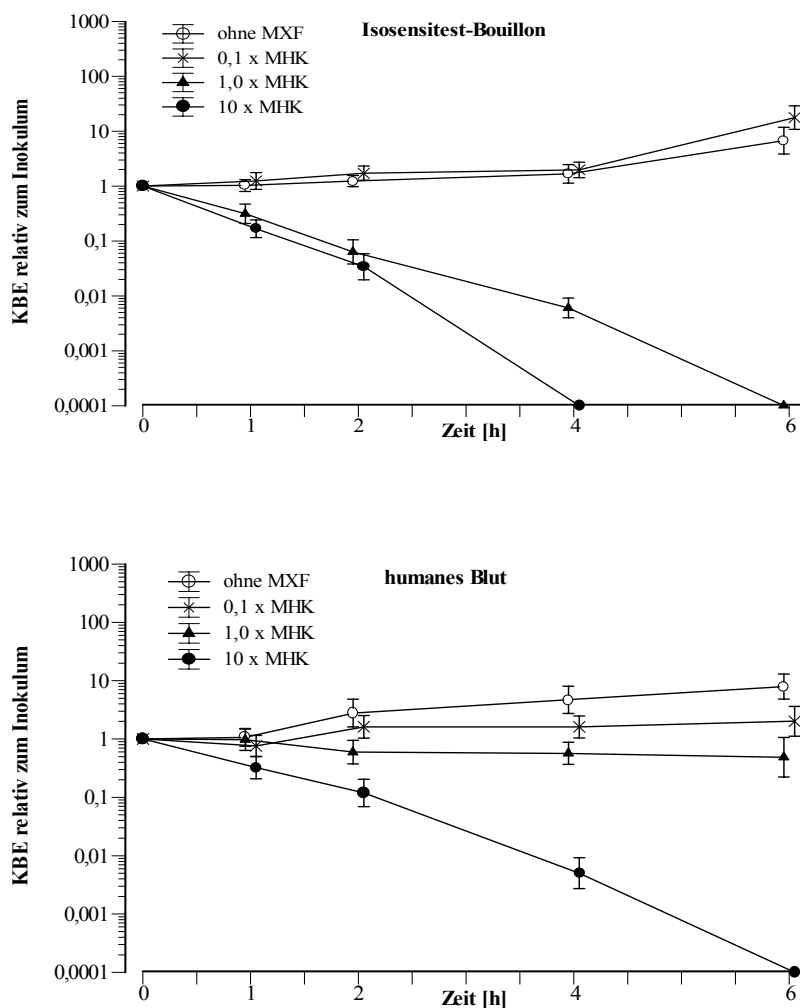


Abb. 5.2.2.3.4. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *S. aureus* MRSA ND (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=4,0 µg/ml)

S. aureus MRSA ND hat mit 4,0 µg/ml einen höheren MHK-Wert für Moxifloxacin als die zuvor getesteten Staphylokokken-Stämme. Auch hier zeigt sich ein Aktivitätsverlust in Blut. Wirkt die einfache MHK in Bouillon noch bakterizid nach ca. 5 Stunden, so wird in Blut nur eine Hemmung der Bakterienvermehrung erreicht. Die zehnfache MHK führt in Bouillon zu einem Abtöten der Keime innerhalb von etwa 3 Stunden; in Blut werden dafür ca. 5 Stunden benötigt.

Tab. 5.2.2.3.1. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,0% in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

<i>S. aureus</i> - Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,06	20 h	3 h	n.e.	12 h
<i>S. aureus</i> MRSA ND	4,00	4 h, w.g.	3 h	n.e.	4 h
<i>S. aureus</i> 1538/00	0,06	n.e.	3 h	n.e.	24 h
<i>S. aureus</i> 2394/00	0,06	n.e.	4 h	n.e.	4 h

n.e.= nicht erreicht, w.g.= wieder gewachsen

Bei Zugabe der einfachen MHK Moxifloxacin wird keine ausreichende Abtötung der Keime innerhalb der ersten 12 Stunden erzielt. Mit der zehnfachen MHK erfolgt eine Reduktion des Inokulums um 99,9 % in Bouillon innerhalb von 3 - 4 Stunden. In humanem Blut werden dazu bis zu 24 h benötigt.

Tab. 5.2.2.3.2. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,9% in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

<i>S. aureus</i> - Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,06	24 h	4 h	n.e.	24 h
<i>S. aureus</i> MRSA ND	4,00	6 h, w.g.	4 h	n.e.	6 h
<i>S. aureus</i> 1538/00	0,06	n.e.	8 h	n.e.	n.e.
<i>S. aureus</i> 2394/00	0,06	n.e.	6 h	n.e.	n.e.

n.e.= nicht erreicht, w.g.= wieder gewachsen

Die einfache MHK erreicht keine Reduktion der Einsaat um 99,9 % innerhalb von 12 Stunden. In Bouillon werden bei Zugabe der zehnfachen MHK alle vier untersuchten *S. aureus*-Stämme abgetötet. In humanem Blut wird nur bei zwei von vier Stämmen eine Reduktion des Inokulums um 99,9 % erreicht.

Ein Aktivitätsverlust von Moxifloxacin in Blut im Vergleich zu Bouillon ist auch hier zu verzeichnen.

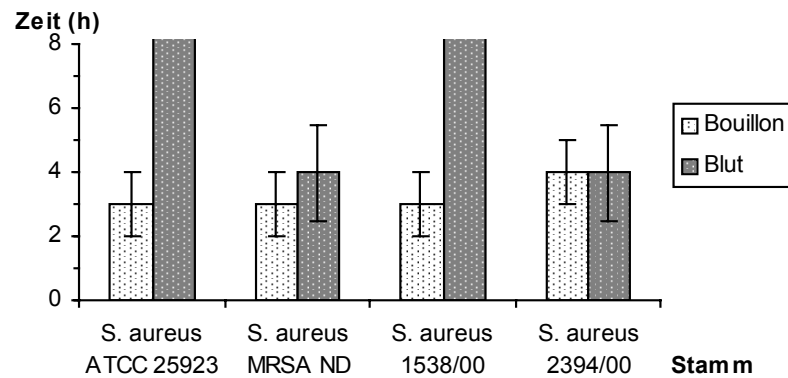


Abb. 5.2.2.3.5. Durchschnittlich benötigte Zeit zur Reduktion des Inokulums um 99,0% in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut bei Verwendung von 10 x MHK Moxifloxacin

Das Säulendiagramm in Abb. 5.2.2.3.5. verdeutlicht, dass bei Zugabe der zehnfachen MHK Moxifloxacin die benötigte Zeit zur Reduktion der Einsaat in humanem Blut länger ist als in Isosensitest-Bouillon.

5.2.4.4. *Enterococcus faecalis*

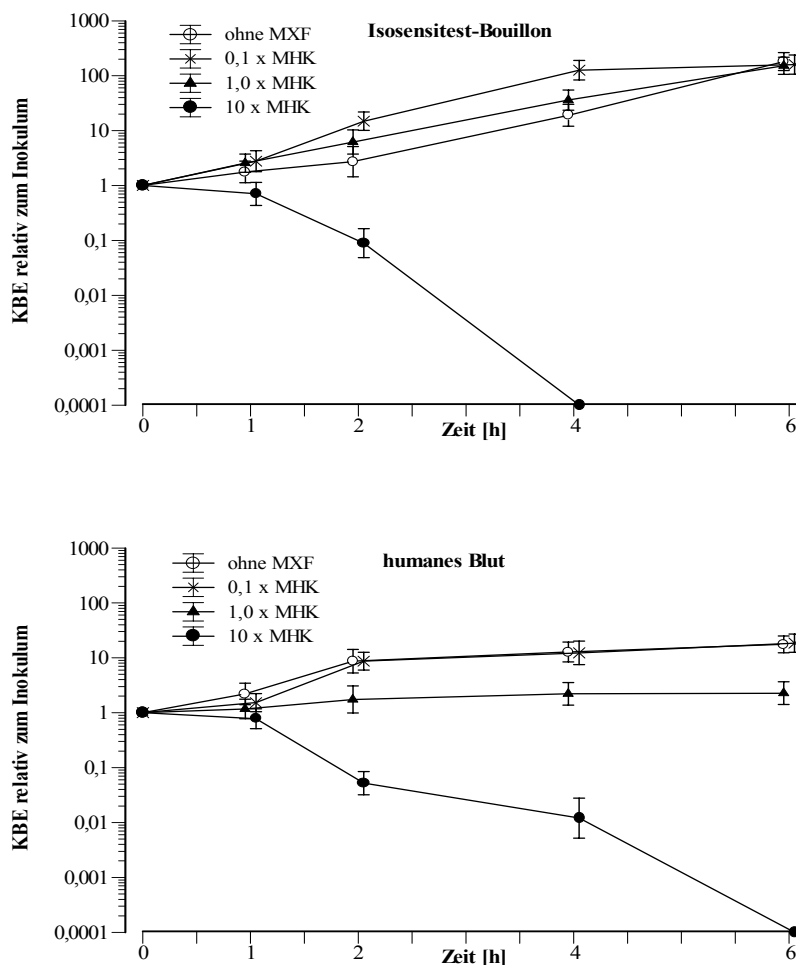


Abb. 5.2.2.4.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *E. faecalis* ATCC 29212 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,25 µg/ml)

Eine Wirkung von Moxifloxacin wird erst bei der zehnfachen MHK erreicht. Gegen *E. faecalis* ATCC 29212 zeigt sich in Blut ein Aktivitätsverlust: Die zehnfache MHK benötigt ca. 5 Stunden zur Abtötung der Keime um 3 log₁₀-Stufen, in Bouillon geschieht das in ca. 3 Stunden.

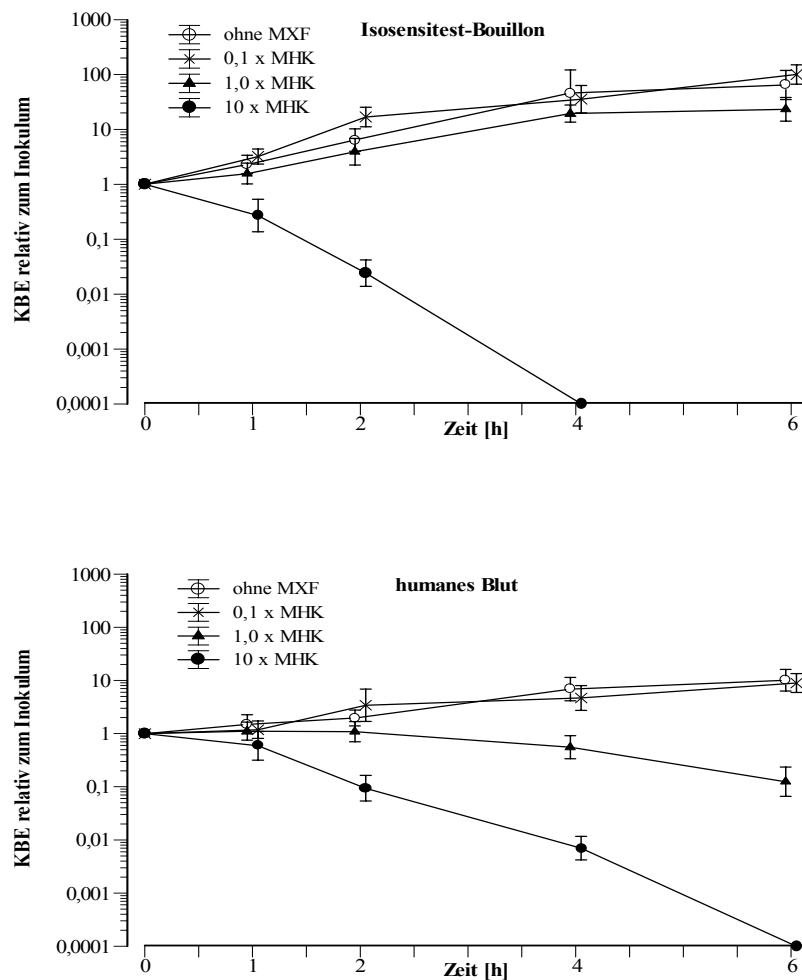


Abb. 5.2.2.4.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *E. faecalis* VS 83 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,25 µg/ml)

Bei dem getesteten *E. faecalis* VS 83 zeigt Moxifloxacin bei der zehnfachen MHK eine bakterizide Wirkung innerhalb von 4 – 6 Stunden sowohl in Bouillon als auch in Blut.

5.2.4.5. *Enterococcus faecium*

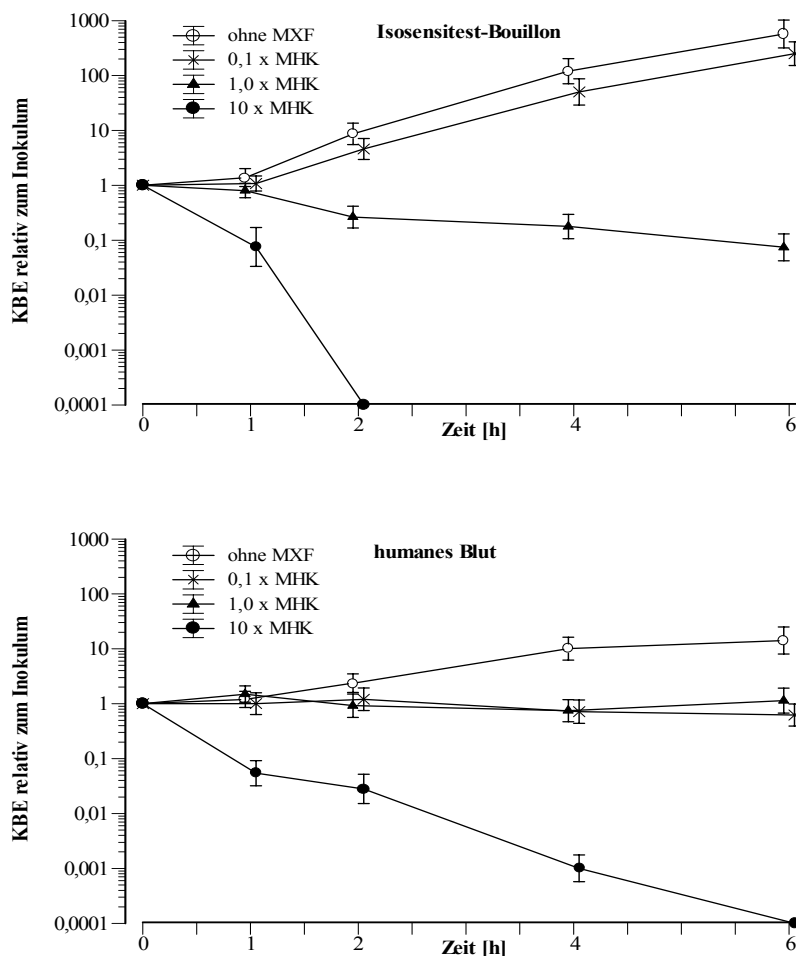


Abb. 5.2.2.5.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *E. faecium* BM 4147 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

In Bouillon zeigt die einfache MHK eine bakteriostatische Aktivität. Die zehnfache MHK wirkt innerhalb von ca. 2 Stunden bakterizid. In humanem Blut ist die Aktivität von Moxifloxacin herabgesetzt. Eine bakterizide Wirkung wird mit der zehnfachen MHK erst innerhalb von etwa 5 Stunden erreicht.

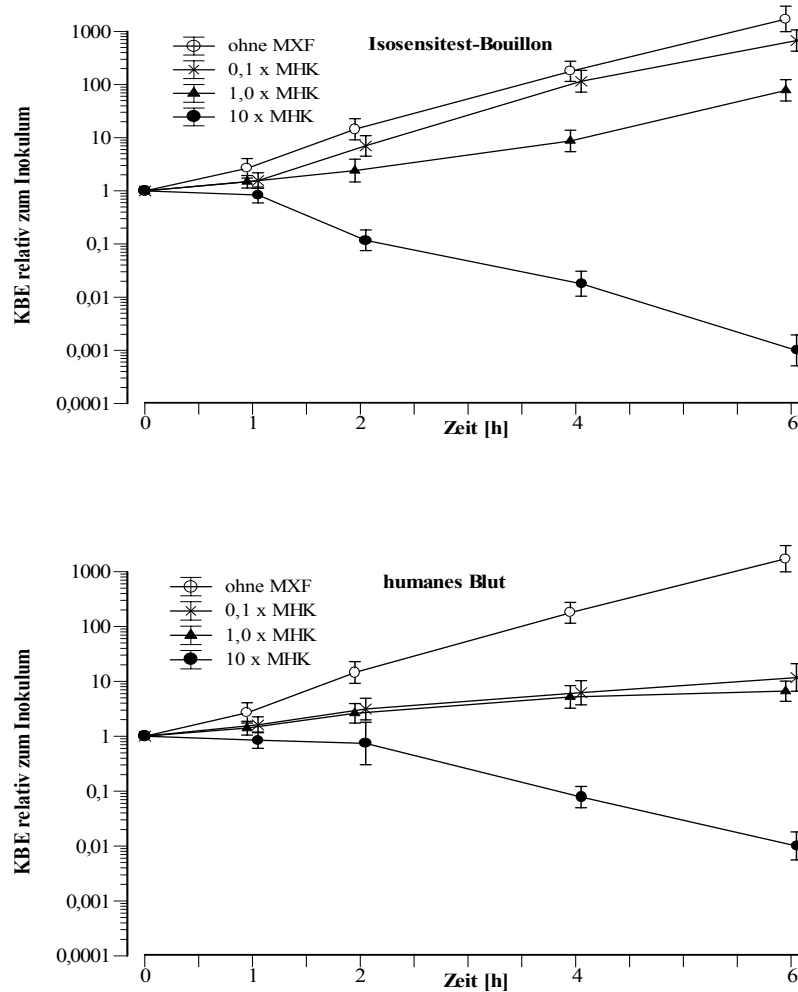


Abb. 5.2.2.5.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber *E. faecium* 14758/99 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Die erzielten Ergebnisse mit *E. faecium* 14758/99 sind vergleichbar mit denen von *E. faecium* BM 4147. Moxifloxacin zeigt erst bei der zehnfachen MHK eine keimreduzierende Wirkung. In humanem Blut ist ein Aktivitätsverlust zu erkennen. Zur Abtötung der Keime werden bei *E. faecium* BM 4147 in Bouillon ca. 5 Stunden benötigt; in Blut kommt es zur Reduktion der Einsaat um 98,0 % innerhalb von acht Stunden und zur Abtötung nach 24 Stunden.

Tab. 5.2.2.4. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,0% in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

Enterokokken - Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,25	n.e.	3 h	n.e.	5 h
<i>E. faecalis</i> VS 83	0,25	n.e.	n.e.	n.e.	8 h
<i>E. faecium</i> BM 4147	1,5	n.e.	0,5 h	n.e.	4 h
<i>E. faecium</i> 14758/99	2,0	n.e.	5 h	n.e.	10 h

n.e.= nicht erreicht

Mit der einfachen MHK wird keine Reduktion der Einsaat um 99,0 % erreicht. Bei der zehnfachen MHK wird dies in Bouillon bei 3 von 4 Keimen und in humanem Blut bei allen vier untersuchten Enterokokken-Stämmen erzielt. In Blut wird dafür mehr Zeit benötigt.

Tab. 5.2.2.5. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Moxifloxacin zur Reduktion des Inokulums um 99,9% in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

Enterokokken - Stamm	MHK (µg/ml)	MXF in Bouillon		MXF in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,25	n.e.	4 h	n.e.	6 h
<i>E. faecalis</i> VS 83	0,25	n.e.	n.e.	n.e.	24 h
<i>E. faecium</i> BM 4147	1,5	n.e.	1 h	n.e.	6 h
<i>E. faecium</i> 14758/99	2,0	n.e.	6 h	n.e.	10 h

n.e.= nicht erreicht

Bei der zehnfachen MHK wird in Bouillon bei drei der vier getesteten Stämme und in humanem Blut bei allen vier Stämmen eine Abtötung um 99,9 % erreicht. In Blut wird dazu mehr Zeit benötigt.

Auch gegen Enterokokken ist in humanem Blut im Vergleich zu Bouillon ein Aktivitätsverlust von Moxifloxacin zu erkennen.

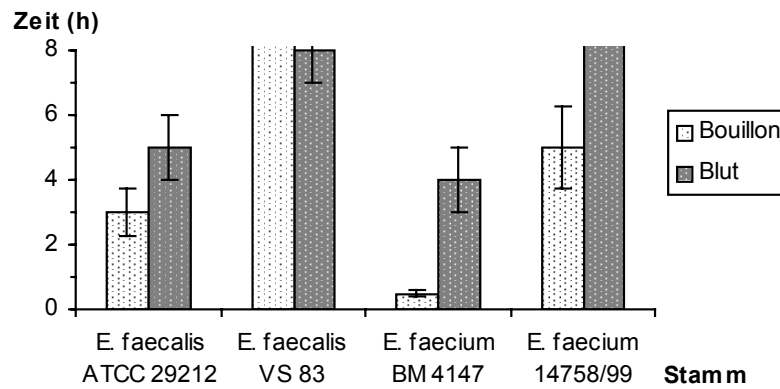


Abb. 5.2.2.5.3. Benötigte Zeit zur Reduktion des Inokulums um 99,0% in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut bei Verwendung von 10 x MHK Moxifloxacin

Das Säulendiagramm in Abb. 5.2.2.5.3. zeigt, dass bei Zugabe der zehnfachen MHK Moxifloxacin die benötigte Zeit zur Reduktion der Einsaat in humanem Blut im Vergleich zu Isosensitest-Bouillon verlängert ist.

5.2.3.LINEZOLID

Aufgrund der Fotosensibilität von Linezolid und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei den Versuchsdurchführungen werden zur Ergebnisbestätigung alle Versuchsreihen doppelt ausgeführt.

5.2.4.1.*Staphylococcus aureus*

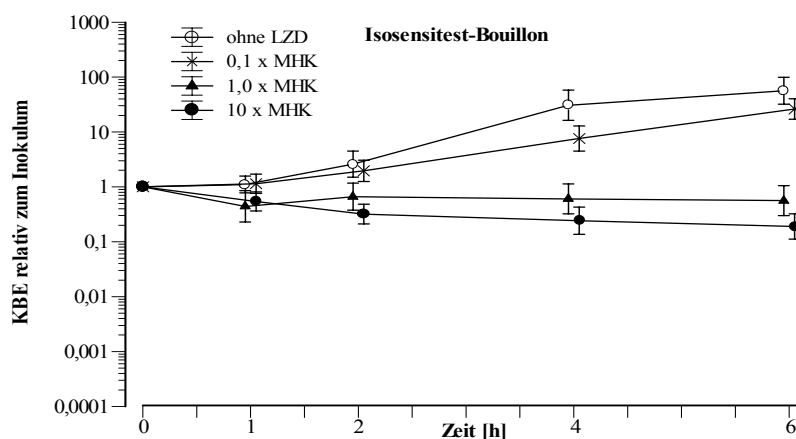


Abb. 5.2.3.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=2,0 µg/ml)

Da Linezolid aufgrund seines Wirkungsmechanismus nur bakteriostatisch ist, wird selbst mit hohen Konzentrationen des Antibiotikums keine Abtötung der Bakterien erreicht. Es wird jedoch eine Vermehrung der Keime bereits bei der einfachen MHK verhindert.

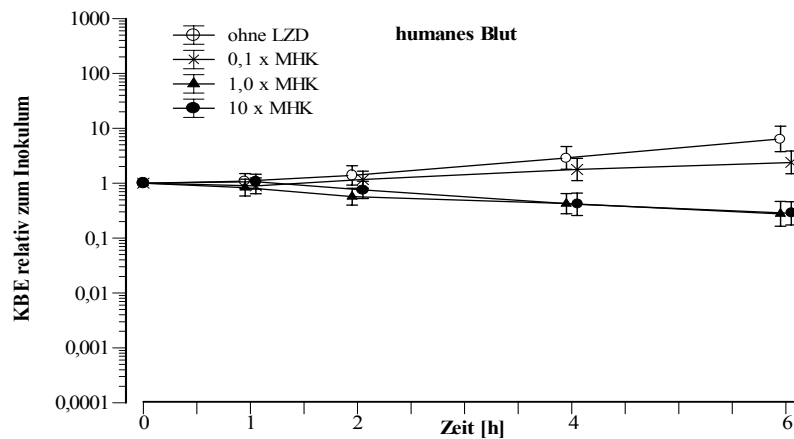


Abb. 5.2.3.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Der getestete Staphylokokken-Stamm hat in Blut eine längere Adaptationszeit, so dass es zu einem verzögerten Heranwachsen kommt. Nach 24 Stunden ist eine Vermehrung um mindestens zwei \log_{10} Stufen zu verzeichnen. Ein Aktivitätsverlust in Blut ist bei Linezolid im Vergleich zu den zuvor getesteten Antiinfektiva nicht vorhanden. Auch hier wirkt die einfache MHK, wie in Bouillon, bereits bakteriostatisch. Nach etwa 6 Stunden ist in Bouillon eine Keimreduktion von ca. 30 % zu verzeichnen. Es kommt aber anschließend zu einem Wiederauswachsen der Bakterien. In humanem Blut wird nach etwa 6 Stunden eine Reduktion der Einsaat von ca. 70 % erreicht, nach 24 Stunden sind noch etwa 20 % der Einsaat vorhanden. Die Aktivität der einfachen MHK Linezolid ist gegen *S. aureus* ATCC 25923 in Blut größer als in Bouillon.

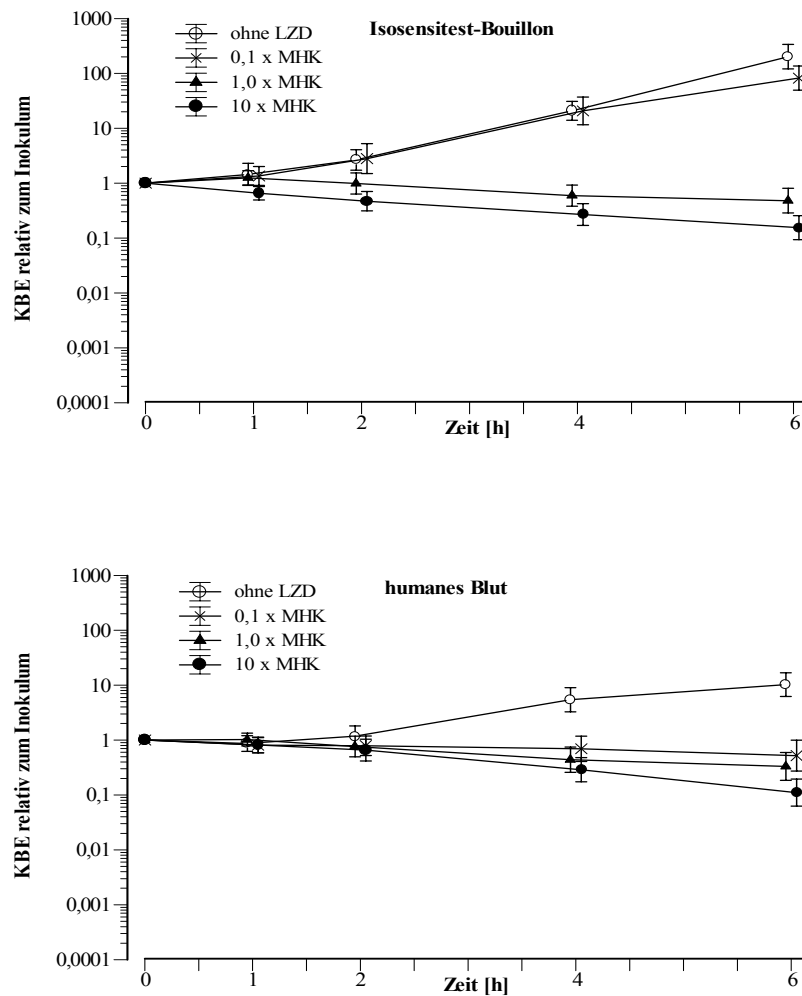


Abb. 5.2.3.1.3. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Auf den Stamm *S. aureus* 1538/00 wirkt Linezolid ebenfalls bakteriostatisch. Bereits die einfache MHK verhindert ein Auswachsen der Keime sowohl in Isosensitest-Bouillon als auch in humanem Blut.

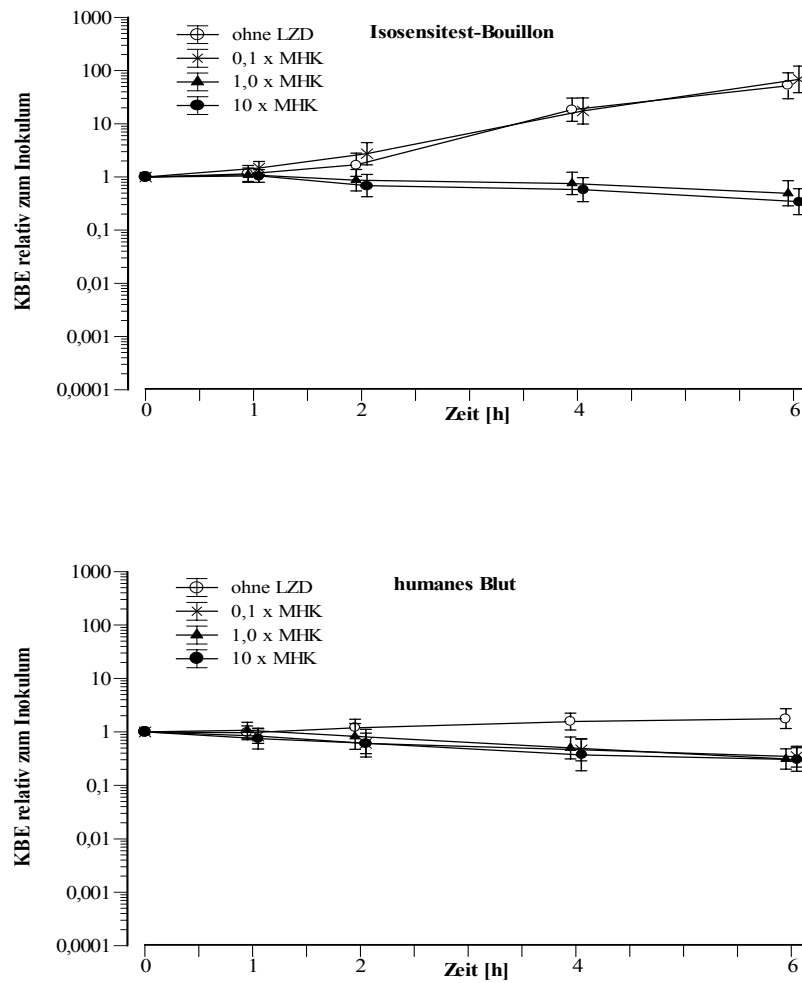


Abb. 5.2.3.1.4. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Linezolid wirkt auch hier sowohl in Bouillon als auch in Blut bereits bei Verwendung der einfachen MHK bakteriostatisch. Eine Vermehrung des *S. aureus* 2394/00-Stammes wird verhindert.

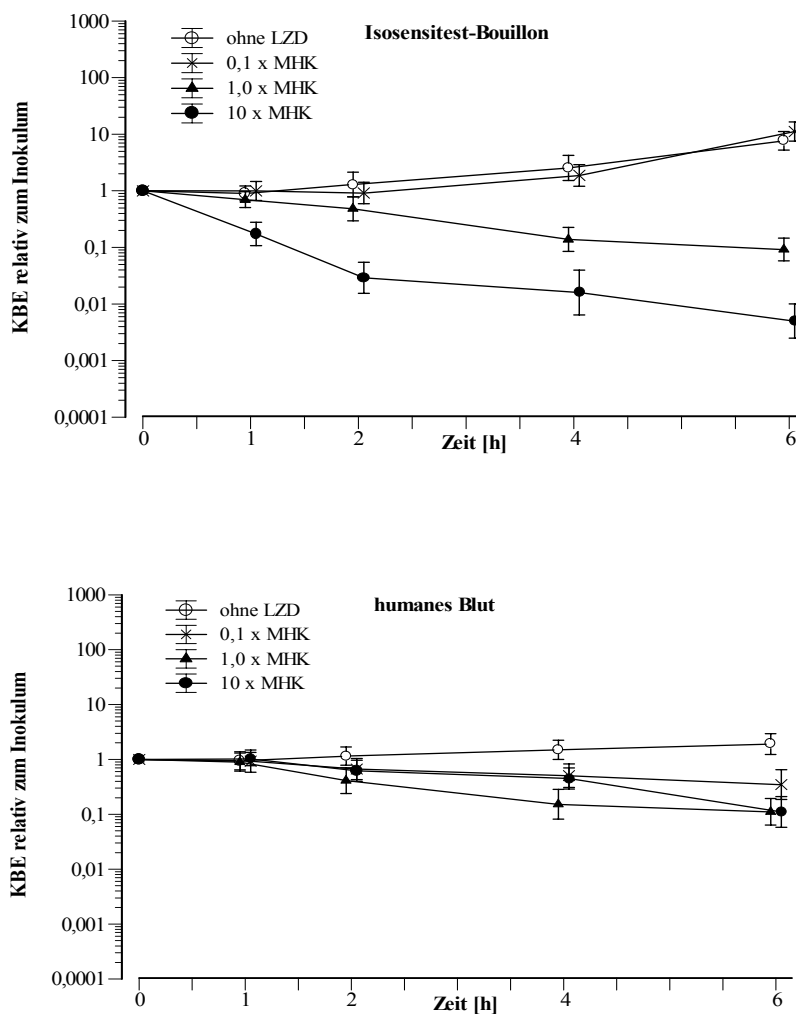


Abb. 5.2.3.1.5. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *S. aureus* MRSA ND (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Auch mit *S. aureus* MRSA ND werden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Bereits bei Konzentrationen im Bereich der einfachen MHK zeigt sich die bakteriostatische Aktivität von Linezolid sowohl in Bouillon als auch in Blut. Es wird jedoch auch bei einer höheren Konzentration als der zehnfachen MHK keine bakterizide Wirkung erzielt.

Bei allen getesteten Staphylokokken ist die Aktivität der einfachen MHK Linezolid in Blut im Vergleich zu Bouillon größer. Bei längerer Versuchsdauer (24 h) kommt es zu einer vermehrten Reduktion der Einsaat. In Bouillon beginnen die Keime nach ca. 8 Stunden sich wieder zu vermehren. In humanem Blut ist kein erneutes Auswachsen der Keime wie in Bouillon zu erkennen.

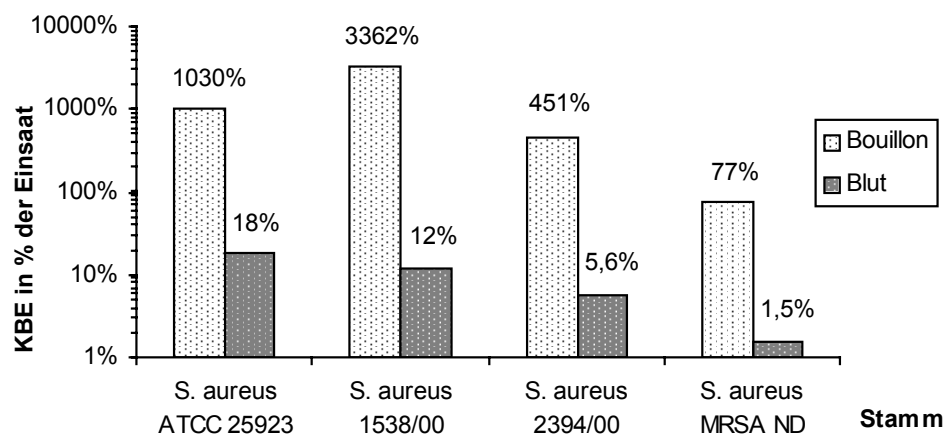


Abb. 5.2.3.1.6. KBE in Prozent der Einsaat nach 24 h bei Verwendung von 1,0 x MHK Linezolid in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut (Mittel aus zwei Versuchsreihen)

Nach 24 h Versuchsdauer kommt es bei Verwendung von der einfachen MHK Linezolid in Bouillon zu einem Auswachsen der Bakterien. In humanem Blut erfolgt eine Reduktion der Einsaat um 80 - 90 %.

5.2.4.2. *Enterococcus faecalis*

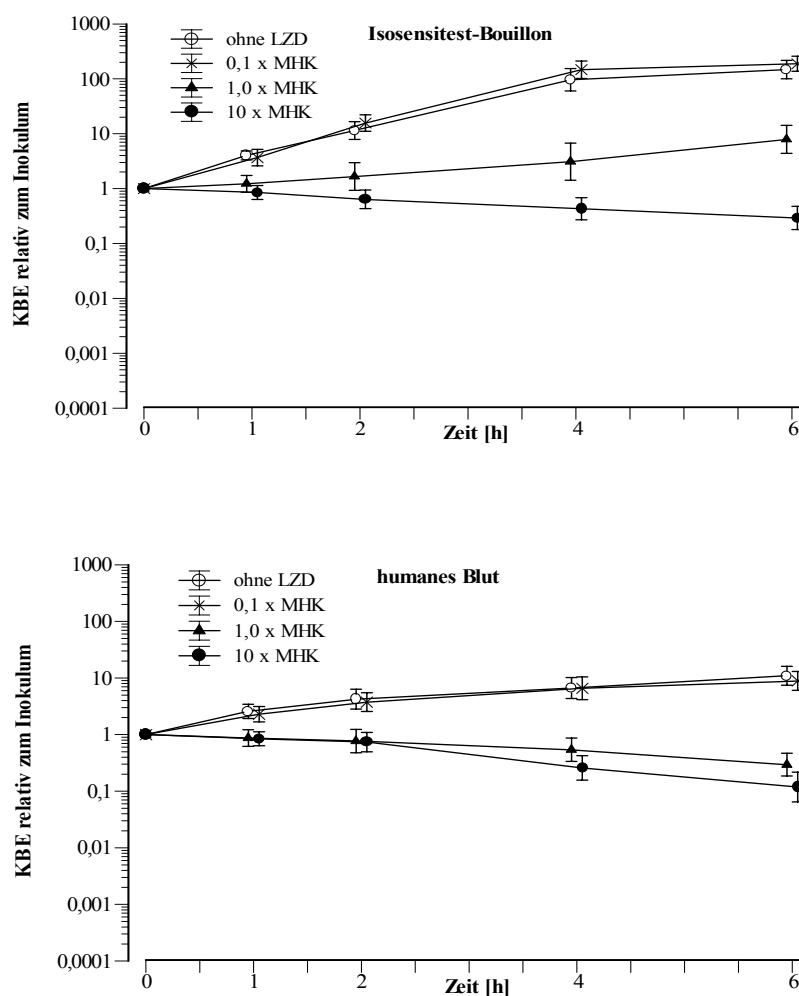


Abb. 5.2.3.2.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *E. faecalis* ATCC 29212 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Die getesteten *E. faecalis*-Stämme haben wie die zuvor untersuchten Staphylokokken eine längere Adaptationszeit in humanem Blut im Vergleich zu Bouillon, wachsen aber über einen Zeitraum von 24 h um mindestens zwei log₁₀-Stufen aus.

Bei den Versuchen mit *E. faecalis* ATCC 29212 ist eine bakteriostatische Wirkung von Linezolid bereits bei der einfachen MHK sowohl in Bouillon als auch in Blut zu erkennen.

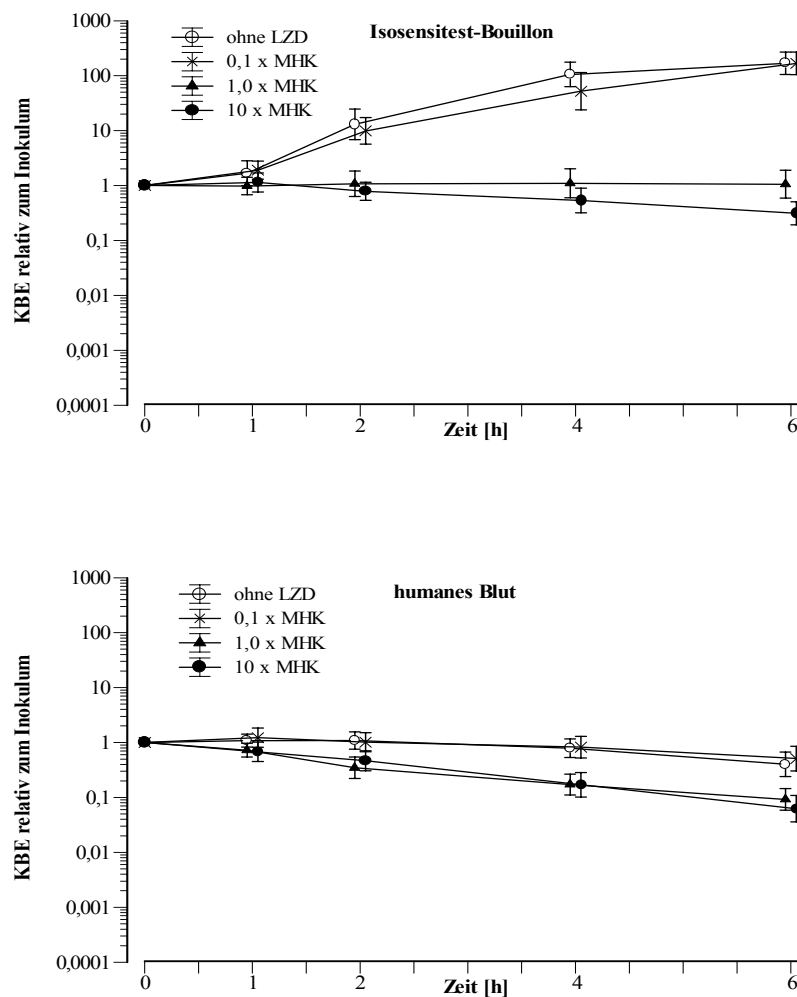


Abb. 5.2.3.2.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *E. faecalis* VS 83 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=2,0 µg/ml)

Linezolid zeigt eine gute bakteriostatische Aktivität sowohl in Bouillon als auch in humanem Blut bereits bei einfacher MHK. Über einen Zeitraum von 24 h ist die Reduktion der Einsaat in Blut im Vergleich zu Bouillon größer. Außerdem kommt es in Bouillon mit der einfachen MHK zu einem erneuten Auswachsen der Keime beginnend nach ca. 6 Stunden.

5.2.4.3. *Enterococcus faecium*

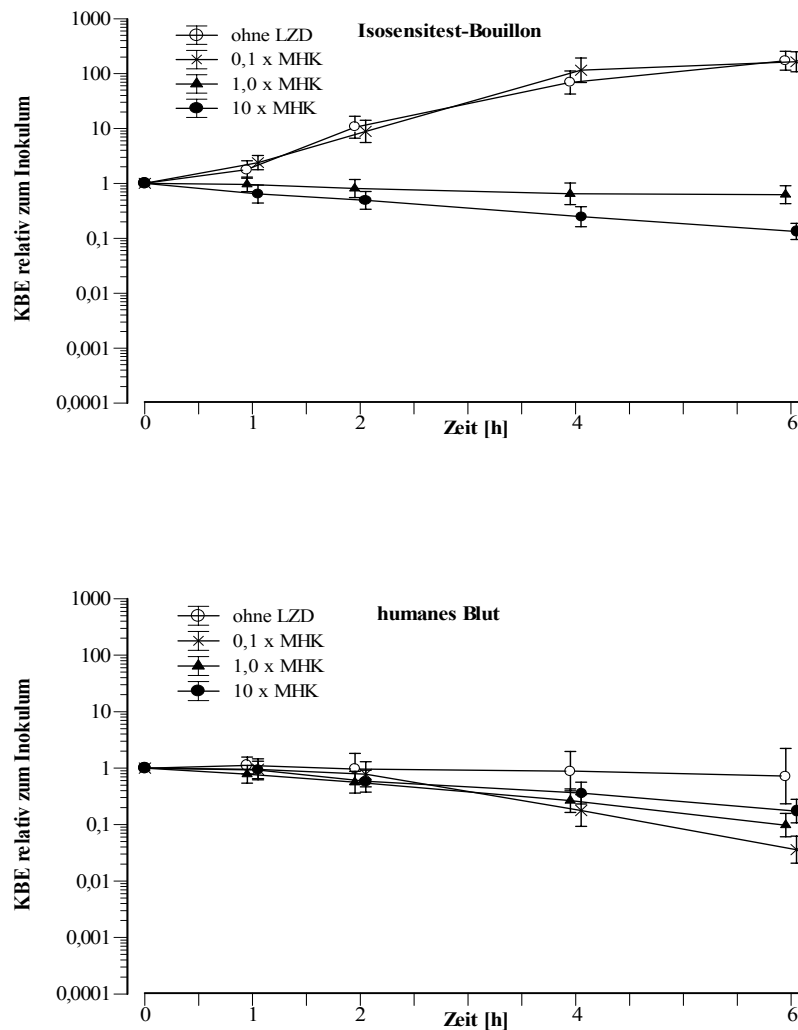


Abb. 5.2.3.3.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *E. faecium* BM 4147 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=4,0 µg/ml)

In Bouillon ist eine gute bakteriostatische Aktivität bei der einfachen MHK von Linezolid zu erkennen.

In humanem Blut kann eine Auswertung nicht erfolgen, da es auch bei längerer Versuchsdauer zu keinem genügenden Auswachsen der Keime gekommen ist.

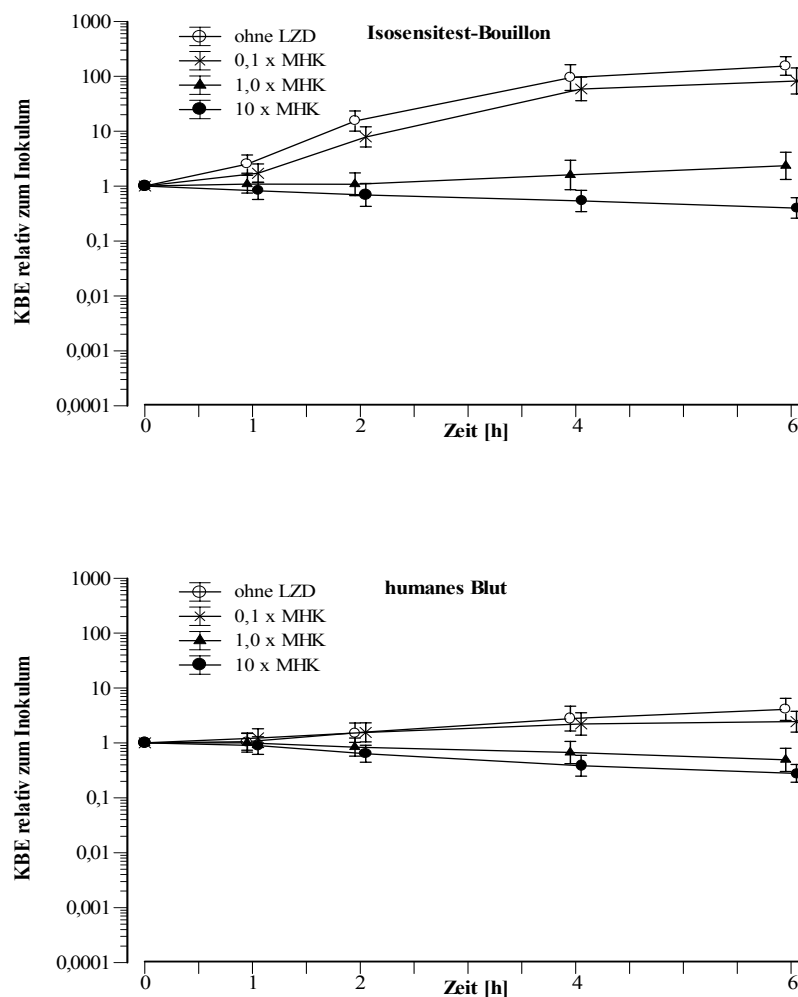


Abb. 5.2.3.3.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber *E. faecium* 14758/99 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=1,0 µg/ml)

Linezolid hat mit der einfachen MHK auch gegen *E. faecium* 14758/99 eine gute bakteriostatische Aktivität sowohl in Bouillon wie auch in humanem Blut. Über 24 h beobachtet kommt es in Bouillon zu einem Wiederauswachsen der Keime.

Bei allen getesteten Enterokokken ist die Aktivität der einfachen MHK Linezolid in Blut im Vergleich zu der in Bouillon größer. Bei längerer Versuchsdauer (24 h) kommt es zu einer vermehrten Reduktion der Einsaat. Durch das Wiederauswachsen der Bakterien ist in Bouillon nach 24 h wieder eine große Anzahl Keime vorhanden. In Blut ist die Keimzahl im Vergleich deutlich geringer.

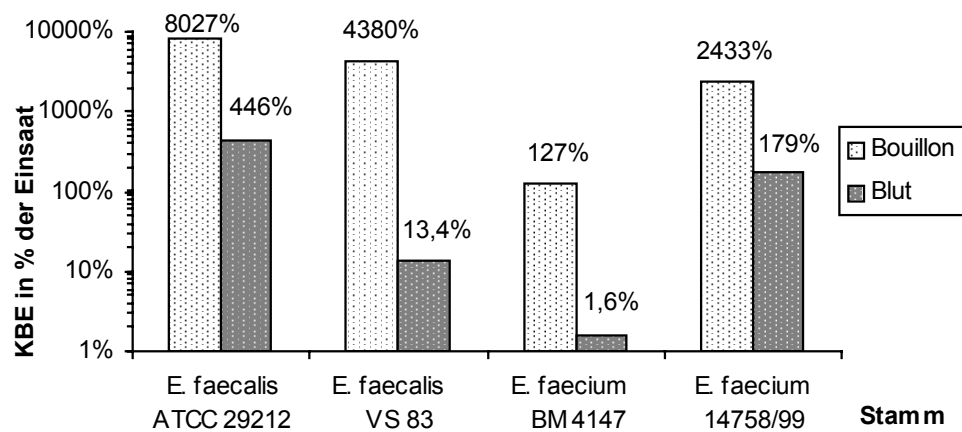


Abb. 5.2.3.3.3. KBE in Prozent der Einsaat nach 24 h bei Verwendung von 1,0 x MHK Linezolid in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut (Mittel aus zwei Versuchsreihen)

Nach 24 h Versuchsdauer wachsen die Bakterien bei Verwendung der einfachen MHK Linezolid in Bouillon aus. In humanem Blut kommt es bei zwei der vier untersuchten Enterokokken-Stämmen zur Reduktion der Einsaat. Bei *E. faecalis* ATCC 29212 und *E. faecium* 14758/99 ist ein geringer Anstieg der Anzahl an KBE zu verzeichnen.

5.2.4.OXACILLIN

5.2.4.1.*Staphylococcus aureus*

Zur Ergebnisbestätigung wurden die Versuchsreihen doppelt durchgeführt.

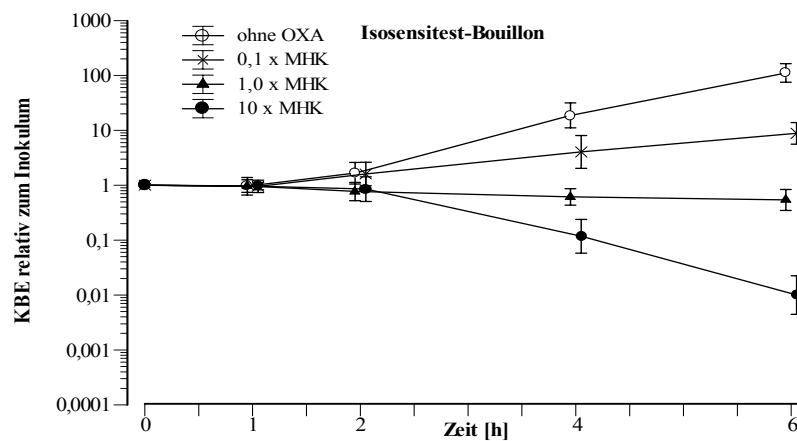


Abb. 5.2.4.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Oxacillin gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon (MHK=0,25µg/ml)

In Bouillon wird bei Verwendung subinhibitorischer Konzentrationen (0,1-fache MHK) das Auswachsen der Keime gehemmt. Sie vermehren sich nur um eine log₁₀-Stufe. Mit der einfachen MHK tritt eine bakteriostatische Wirkung ein. Bei Zugabe der zehnfachen MHK kommt es zur Reduktion der Einsaat um 99,0 % innerhalb der ersten 6 Stunden. Anschließend nimmt die Zahl der KBE wieder zu, so dass nach 24 h etwa 25 % der Einsaat vorhanden sind.

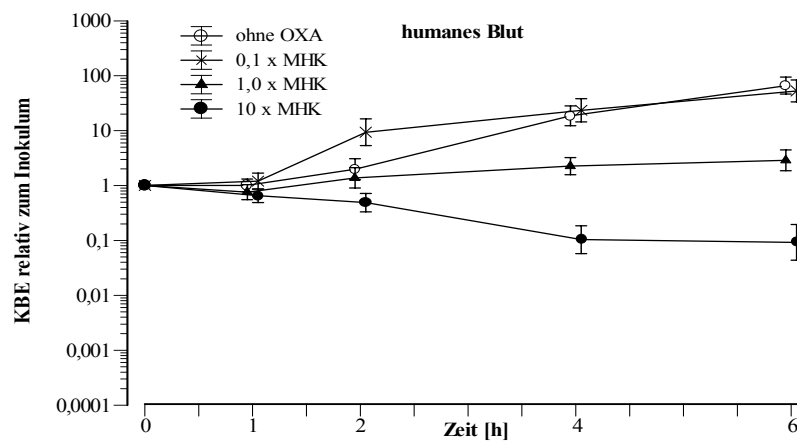


Abb. 5.2.4.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Oxacillin gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in humanem Blut (MHK=0,25 µg/ml)

In humanem Blut ist die Aktivität von Oxacillin geringer. Die 0,1-fache MHK zeigt keine Wirkung. Die einfache MHK wirkt bakteriostatisch. Mit der zehnfachen MHK wird eine Reduktion des Inokulums innerhalb der ersten 6 Stunden um ca. 90 % erreicht.

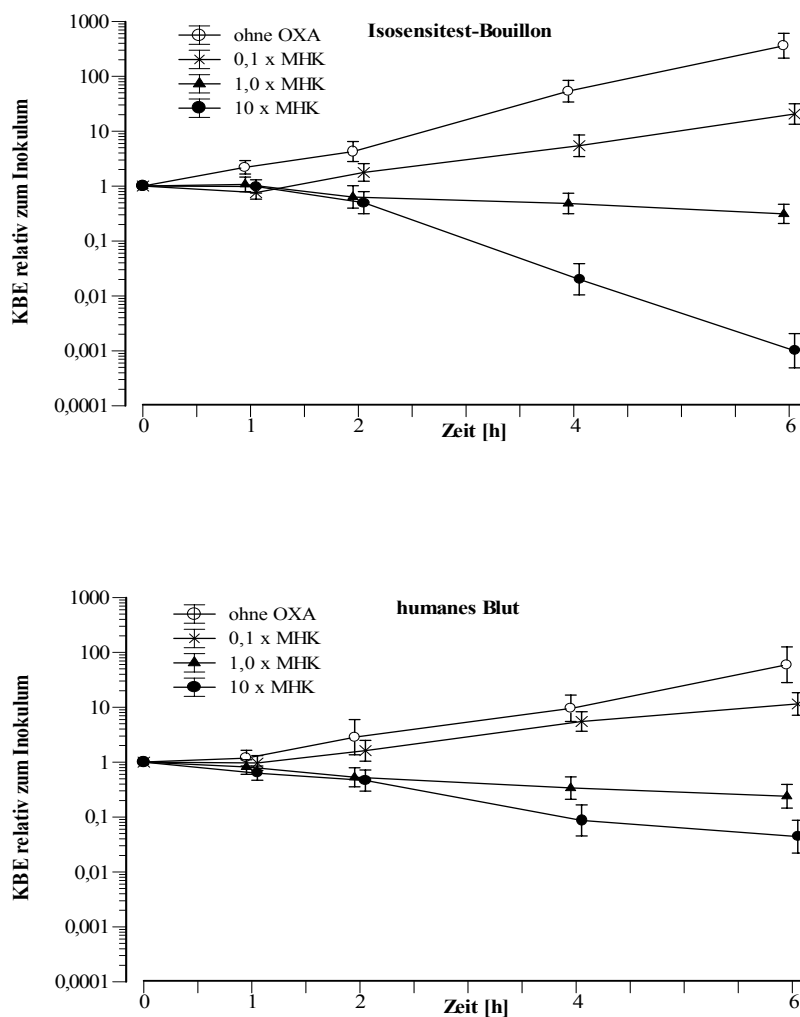


Abb. 5.2.4.1.3. Bakterizidie-Kinetik von Oxacillin gegenüber *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,25 µg/ml)

Auch hier wird in Bouillon in subinhibitorischen Konzentrationen eine bakteriostatische Wirkung erzielt. Mit der zehnfachen MHK wird eine Reduktion des Inokulums um 99,8 % innerhalb von 6 Stunden erreicht. In humanem Blut ist die Aktivität geringer. Mit der zehnfachen MHK wirkt Oxacillin bakteriostatisch.

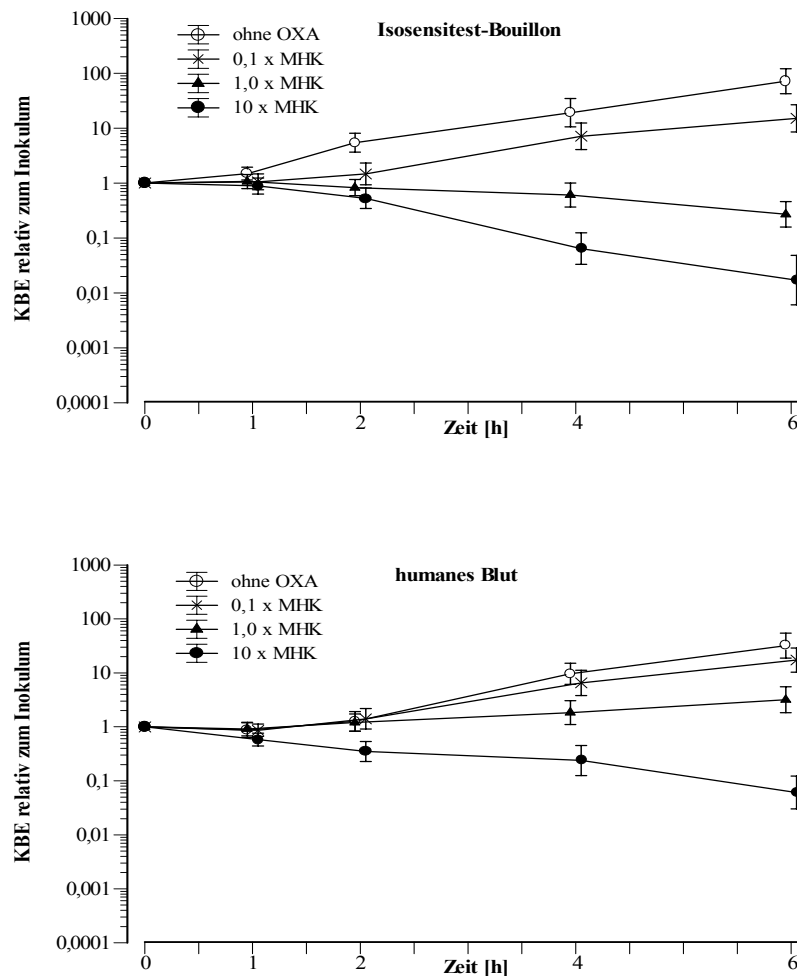


Abb. 5.2.4.1.4. Bakterizidie-Kinetik von Oxacillin gegenüber *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,25 µg/ml)

Bei dem untersuchten *S. aureus* 2394/00-Stamm ist in Isosensitest-Bouillon eine gute bakterizide Aktivität von Oxacillin mit der zehnfachen MHK zu verzeichnen. Es kommt zur Reduktion der Einsaat um ca. 99,0 %. Mit der einfachen MHK erfolgt in Bouillon eine Keimreduktion von ca. 60,0 %.

In humanem Blut ist die Aktivität geringer. Die einfache MHK führt zu keinerlei Reduktion der Einsaat; die zehnfache MHK tötet die Bakterien um ca. 95,0 % ab.

Vergleich der benötigten Zeiten zur Reduktion der Einsaat:

Tab. 5.2.4.1. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Oxacillin zur Reduktion des Inokulums um 99,0 % in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

<i>S. aureus</i> - Stamm	MHK (µg/ml)	OXA in Bouillon		OXA in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,25	n.e.	6 h	n.e.	n.e.
<i>S. aureus</i> 1538/00	0,25	n.e.	5 h	n.e.	n.e.
<i>S. aureus</i> 2394/00	0,25	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

n.e.= nicht erreicht

Die Zeittabelle verdeutlicht den Aktivitätsverlust von Oxacillin in humanem Blut im Vergleich zu Bouillon. Ein Abtöten der Keime um 99 % wird in Bouillon nach ca. 6 Stunden erreicht. Bei *S. aureus* 2394/00 wird eine Abtötung von ca. 97 % nach 6 h erzielt. In Blut wird die Einsaat um etwa 90,0 % reduziert.

5.2.5.CEFUROXIM

5.2.5.1.*Staphylococcus aureus*

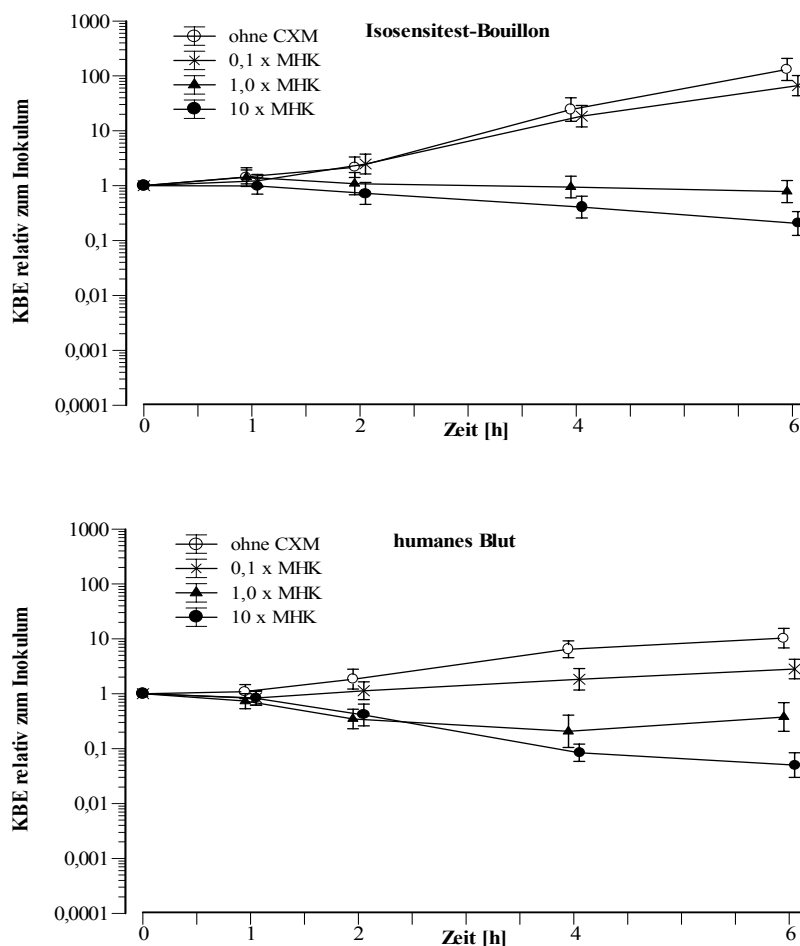


Abb. 5.2.5.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Cefuroxim gegenüber *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=0,5 µg/ml)

In Bouillon wirkt Cefuroxim in einfacher und zehnfacher MHK gegen *S. aureus* ATCC 25923 bakteriostatisch. In humanem Blut ist mit der einfachen MHK ein verzögertes Auswachsen der Keime zu erkennen. Auch in zehnfacher MHK wirkt Cefuroxim nur bakteriostatisch.

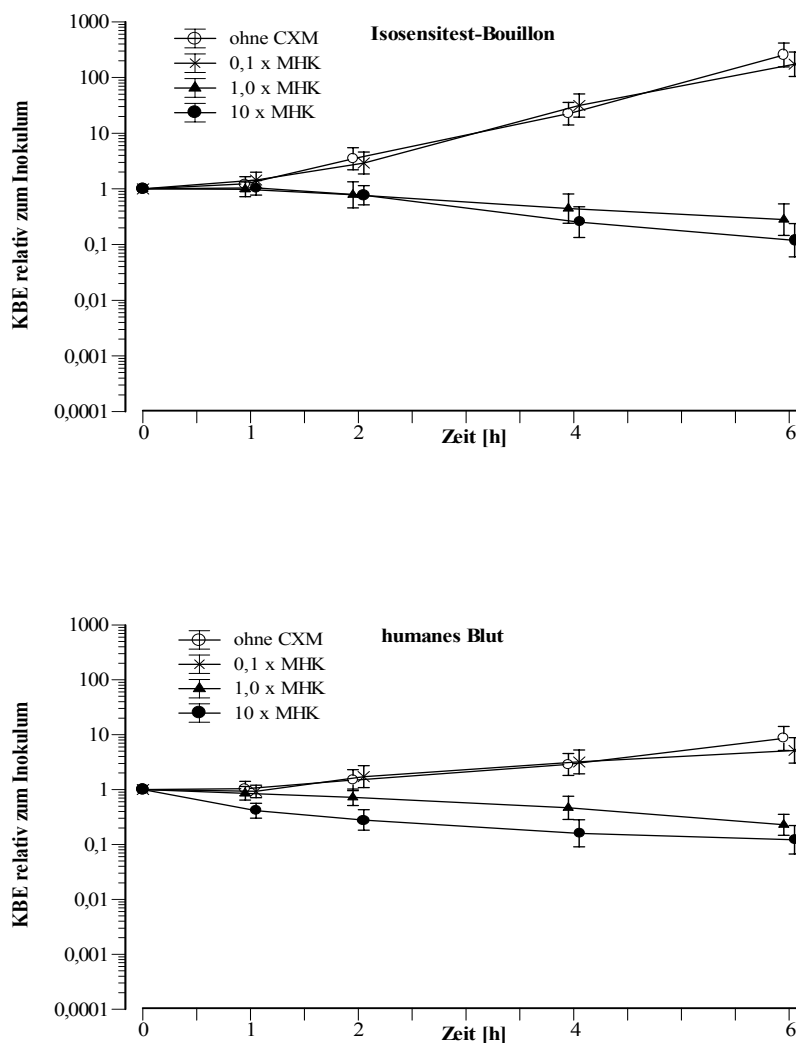


Abb. 5.2.5.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Cefuroxim gegenüber *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=1,0 µg/ml)

Die einfache sowie die zehnfache MHK Cefuroxim zeigen gegen *S. aureus* 1538/00 in Isosensitest-Bouillon nur eine geringe Aktivität. Die Einsaat wird um ca. 20 % mit der einfachen und um ca. 75 % mit der zehnfachen MHK reduziert. In humanem Blut wirkt die einfache MHK bakteriostatisch, die zehnfache MHK reduziert das Inokulum ebenfalls nur um ca. 80 %.

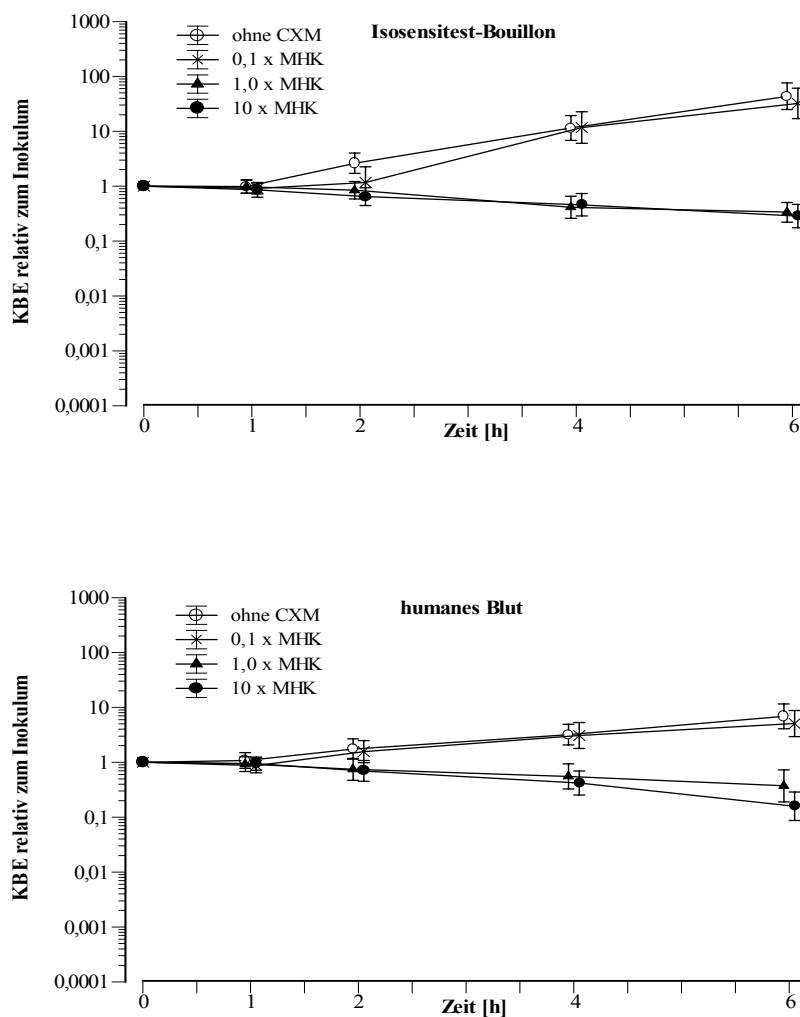


Abb. 5.2.5.1.3. Bakterizidie-Kinetik von Cefuroxim gegenüber *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus zwei Versuchsreihen) in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut (MHK=1,0 µg/ml)

Cefuroxim zeigt in Bouillon bei der zehnfachen MHK nur eine geringe Aktivität gegen *S. aureus* 2394/00. Innerhalb von 6 Stunden werden ca. 60 % und innerhalb von 24 Stunden etwa 70 % der Einsaat abgetötet. In humanem Blut erfolgt mit der zehnfachen MHK innerhalb von 6 Stunden eine Reduktion der Einsaat um ca. 85 %.

Da Cefuroxim ein Abtöten der Keime um 99,0 % nicht erreicht, wird ein Zeitvergleich für die Reduktion der Einsaat um 90,0 % dargestellt:

Tab. 5.2.5.1. Durchschnittlich benötigte Zeit in Stunden (h) von Cefuroxim zur Reduktion des Inokulums um 90,0 % in Isosensitest-Bouillon und in humanem Blut

<i>S. aureus</i> - Stamm	MHK (µg/ml)	CXM in Bouillon		CXM in humanem Blut	
		1,0xMHK	10xMHK	1,0xMHK	10xMHK
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,5	n.e.	24 h	n.e.	4 h
<i>S. aureus</i> 1538/00	1,0	n.e.	n.e.	n.e.	4 h
<i>S. aureus</i> 2394/00	1,0	n.e.	n.e.	n.e.	6 h

Die zehnfache MHK Cefuroxim wirkt gegen die getesteten Staphylokokken in Blut besser und schneller als in Bouillon. Es wird eine Reduktion der Einsaat um 90 % innerhalb von 3 - 6 Stunden erzielt.

In Isosensitest-Bouillon erreicht Cefuroxim nur bei *S. aureus* ATCC 25923 eine Abtötung um 90 % innerhalb von 24 h.

5.3. PHAGOZYTOSE

5.3.1. EINFÜHRUNG

Die Mehrzahl der bakteriellen Krankheitserreger kommt in infizierten Wirtsorganismen extrazellulär beispielsweise im Blutplasma, Liquor, Lymphe oder Interstitialraum vor. Allerdings vermögen eine Reihe von pathogenen Bakterien in Wirtszellen einzudringen und dort zu überleben oder sogar zu proliferieren. Die Antibiotikabehandlung derartiger Infekte stellt besondere Anforderungen an Wirkstoffe, und ihre Effektivität gegenüber intrazellulären Erregern muss experimentell belegt werden. Für die hier betrachteten bakteriellen Erreger wurden Granulozyten als Wirtszellen gewählt. Die Bakterien werden nach Serum-Opsonisierung isolierten, humanen Granulozyten angeboten und die beladenen Wirtszellen anschließend mit Hilfe eines PercollTM-Dichtegradienten angereichert. Nach Zugabe des Antibiotikums kann beurteilt werden, ob und in wie weit es auf die intraphagozytären Bakterien wirkt (siehe Kapitel 4.3). Zur Ergebnisbestätigung werden aufgrund des komplizierten Versuchsaufbaus alle Reihen der Phagozytoseversuche dreimal durchgeführt.

Tulkens et al. haben die Anreicherung und subzelluläre Verteilung verschiedener Antiinfektiva in Makrophagen untersucht. β -Lactam-Antibiotika sind schwache organische Säuren und können sich daher nicht intrazellulär anreichern [Tulkens 115]. Ähnliche Ergebnisse erzielte Tulkens auch bei der Untersuchung der Glycopeptide, deren intrazelluläre Konzentration nur wenig höher war als die extrazelluläre [Tulkens 116]. Aufgrund dieser Daten werden keine Untersuchungen mit β -Lactam-Antibiotika und Vancomycin in diesem Abschnitt durchgeführt.

5.3.2. MOXIFLOXACIN

5.3.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

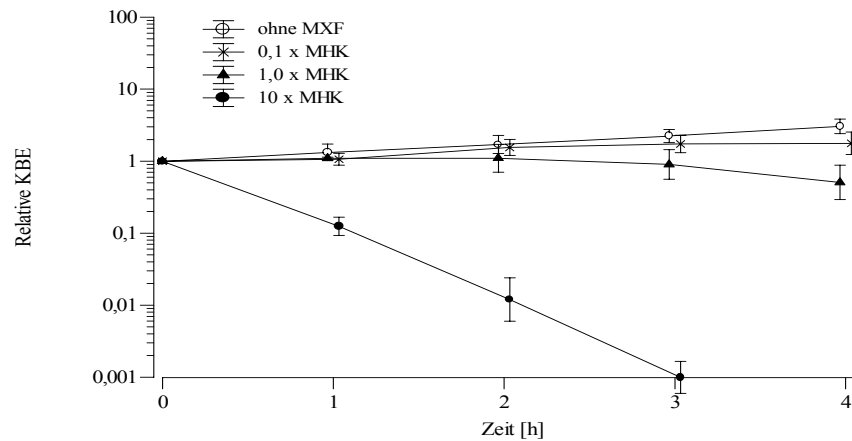


Abb. 5.3.2.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären Penicillinempfindlichen *S. pneumoniae*-Stämmen (Mittel aus 4 Stämmen, MHK=0,25 µg/ml)

Phagozytierte Penicillin-sensible Pneumokokken haben eine schlechte Überlebensrate. Trotz zahlreicher Versuchsreihen, in denen sowohl das Verhältnis Granulozyten zu Pneumokokken wie die Opsonisierungs- und Phagozytosedauer variiert wurde, werden nur wenige verwertbare Ergebnisse erzielt. Für Penicillin-sensible Pneumokokken wird ein Verhältnis Granulozyten zu Pneumokokken von 1:100 gewählt und die Opsonisierungs- wie auch Phagozytosedauer beträgt je ½ Stunde.

Eine intraphagozytäre Vermehrung der Bakterien ist nicht zu beobachten.

Bei Zugabe von der zehnfachen MHK Moxifloxacin wird innerhalb von ca. 3 Stunden ein bakterizider Effekt erzielt.

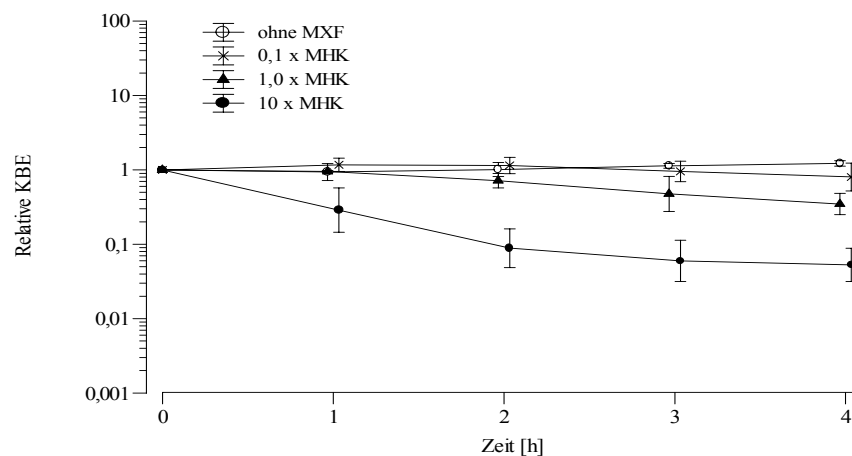


Abb. 5.3.2.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären Penicillin-resistenten *S. pneumoniae*-Stämmen (Mittel aus 3 Stämmen, MHK=0,25 µg/ml)

Mit der zehnfachen MHK Moxifloxacin wird eine Keimreduktion um ca. 80 % erreicht.

Ingesamt beobachtet man bei Versuchen mit Pneumokokken bei Zugabe von der einfachen MHK einen bakteriostatischen Effekt. Bei Verwendung der zehnfachen MHK erfolgt eine Reduktion der Einsaat um 80 % - 98 %.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Versuchsreihen in Vollblut (Kap. 5.2.2.1., 5.2.2.2.), erkennt man, dass es bei nicht phagozytierten Bakterien in Vollblut schneller zur Keimreduktion kommt. Bei Zugabe von der zehnfachen MHK sind nach vier Stunden bereits ca. 99,0 % der Einsaat abgetötet.

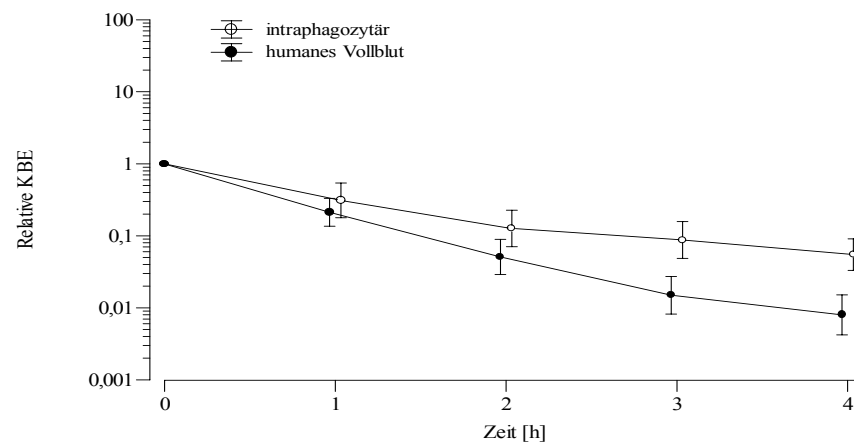


Abb. 5.3.2.1.3. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Moxifloxacin gegen Penicillin-resistente *S. pneumoniae* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.2.2. *Staphylococcus aureus*

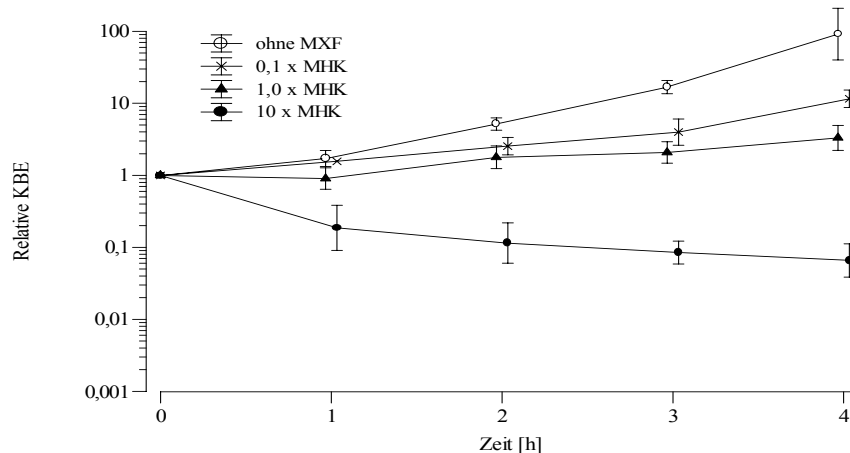


Abb. 5.3.2.2.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=0,06 µg/ml)

Ohne Zugabe von Moxifloxacin kommt es zu einer Keimvermehrung um etwa zwei log₁₀-Stufen. Bei der 0,1-fachen MHK und der einfachen MHK tritt ein subinhibitorischer Effekt ein. Die Vermehrung der Bakterien wird gehemmt. Eine Abtötung um ca. 90 % der Einsaat erfolgt bei zehnfacher MHK innerhalb von 4 Stunden.

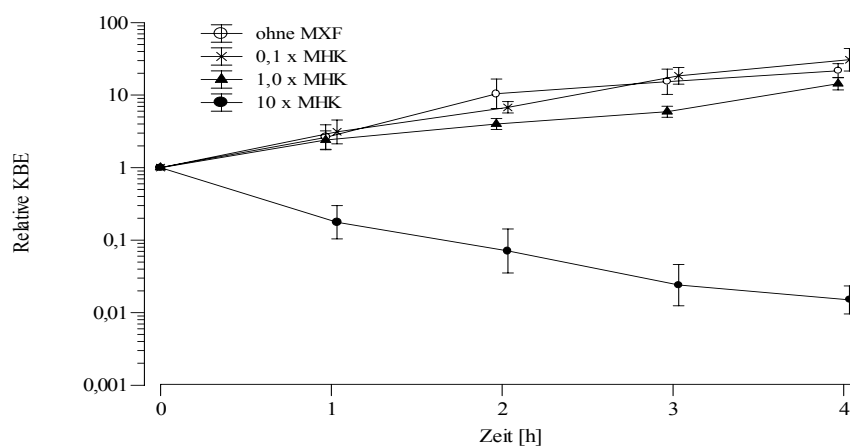


Abb. 5.3.2.2.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=0,06 µg/ml)

Hier ist bakterizide Aktivität von Moxifloxacin bei zehnfacher MHK zu erkennen. Das Inokulum wird innerhalb von vier Stunden um ca. 95 % reduziert.

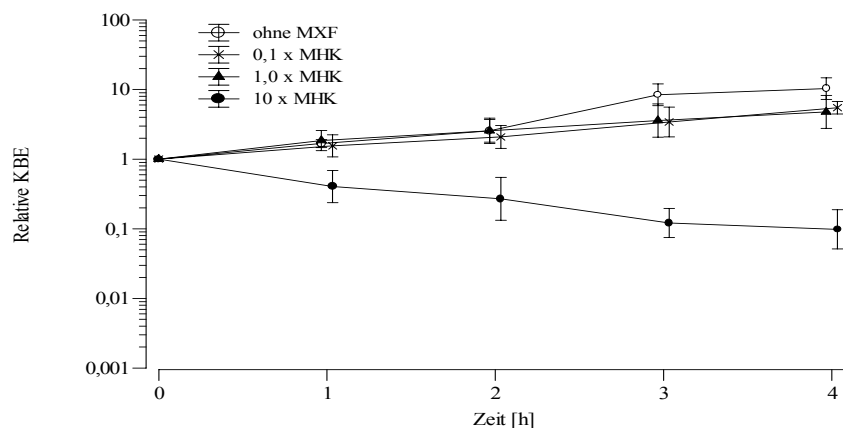


Abb. 5.3.2.2.3. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=0,06 µg/ml)

Auch hier werden die Keime erst bei der zehnfachen MHK abgetötet. Innerhalb des Versuchszeitraumes wird die Einsaat um ca. 90% reduziert.

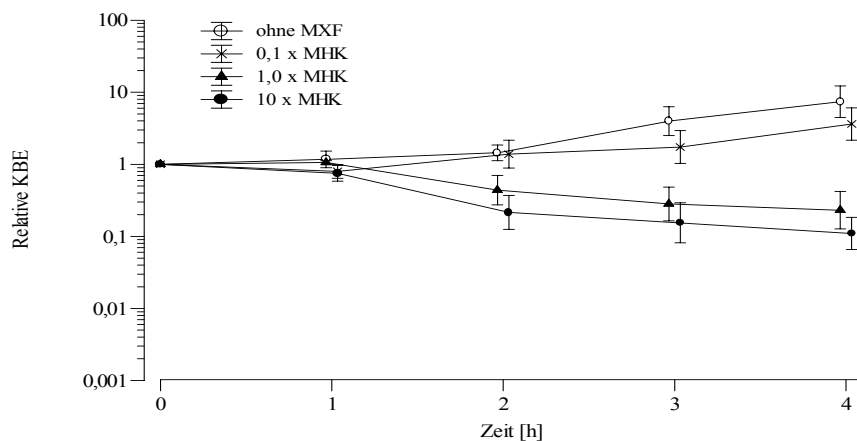


Abb. 5.3.2.2.4. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *S. aureus* MRSA ND (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=4,0 µg/ml)

Bei den Versuchsreihen mit dem MRSA-Stamm, der mit 4,0 µg/ml eine höhere MHK für Moxifloxacin im Vergleich zu den übrigen getesteten Staphylokokken hat, ist das Ergebnis ähnlich. Bei der zehnfachen MHK kommt es zur Reduktion des Inokulums um ca. 85 %.

Alle getesteten *S. aureus*-Stämme vermehren sich intraphagozytär innerhalb von vier Stunden um mindestens ein bis zwei \log_{10} Stufen. Bei Zugabe der einfachen MHK tritt bei zwei der vier getesteten Isolaten (*S. aureus* ATCC 25923 und MRSA ND) eine bakteriostatische Wirkung ein. Mit zehnfacher MHK wird bei allen vier getesteten Stämmen das Inokulum um 85 % - 95 % während der Versuchsdauer reduziert.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Bakterizidie-Kinetik in Vollblut (siehe Kap. 5.2.2.3.), so zeigt sich ein geringer Aktivitätsverlust von Moxifloxacin gegenüber intraphagozytären *S. aureus*-Stämmen. In Vollblut erfolgt mit zehnfacher MHK eine Reduktion der Einsaat um ca. 95 % - 99 % innerhalb der ersten vier Stunden. Bei den intraphagozytären Keimen wird im gleichen Zeitraum eine Abtötung um ca. 85 % - 95 % erreicht.

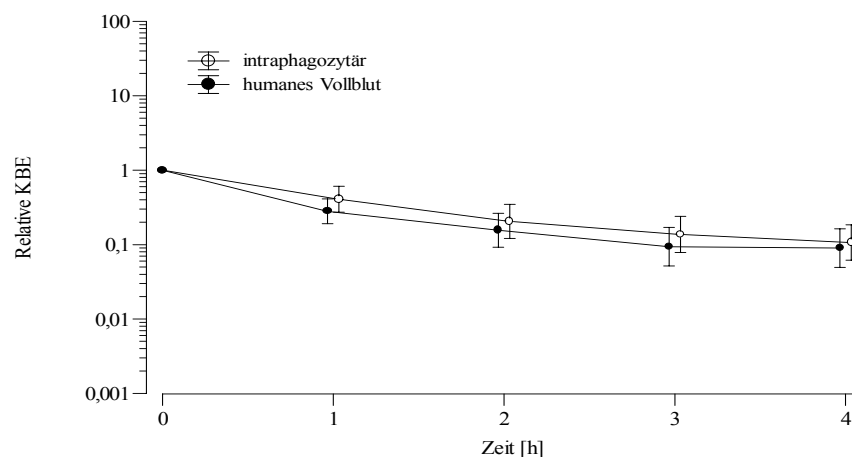


Abb. 5.3.2.2.5. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Moxifloxacin gegen *S. aureus* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.2.3. *Enterococcus faecalis*

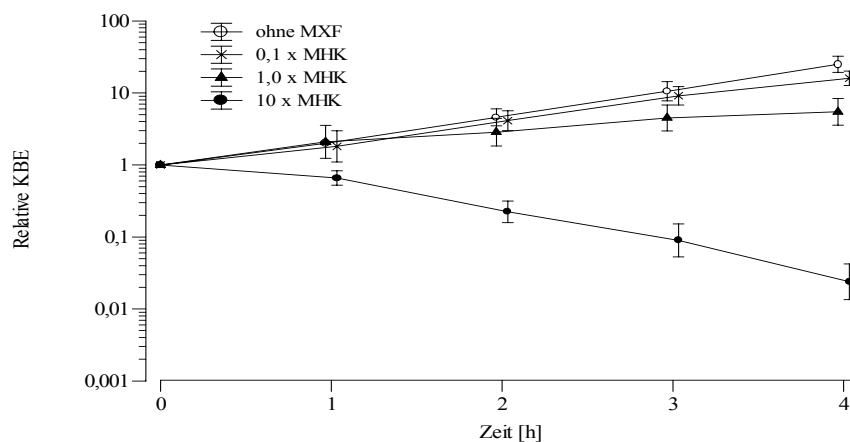


Abb. 5.3.2.3.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *E. faecalis* ATCC 29212 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=0,25 µg/ml)

Intrazellulär ist innerhalb von 4 Stunden eine Keimvermehrung der getesteten Enterokokken-Stämme von etwa einer log₁₀-Stufe zu beobachten.

Bei zehnfacher MHK Moxifloxacin kommt es zur Reduktion der Einsaat von *E. faecalis* ATCC 29212 um ca. 95 %.

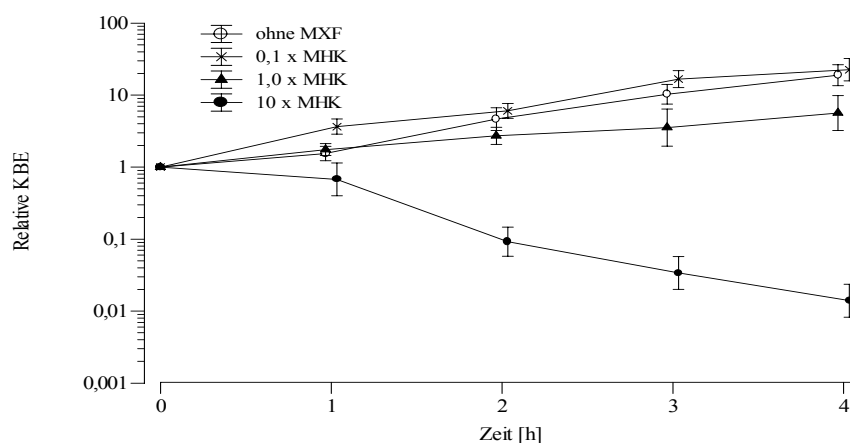


Abb. 5.3.2.3.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *E. faecalis* VS 83 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=0,25 µg/ml)

Bei der zehnfachen MHK werden ca. 95 % der Einsaat von *E. faecalis* VS 83 abgetötet.

Mit der einfachen MHK Moxifloxacin tritt eine bakteriostatische Wirkung gegen die getesteten intrazellulären *E. faecalis* – Stämme ein. Bei Zugabe der zehnfachen MHK wird das Inokulum innerhalb von vier Stunden um ca. 95 % reduziert.

Im Vergleich zur Bakterizidie-Kinetik in humanem Vollblut ist ein geringer Aktivitätsverlust zu verzeichnen (siehe Kap. 5.2.2.4.). In Vollblut werden innerhalb von vier Stunden ca. 98 % der Einsaat abgetötet; intraphagozytär sind es ca. 94 % (siehe Abb. 5.3.2.3.3.).

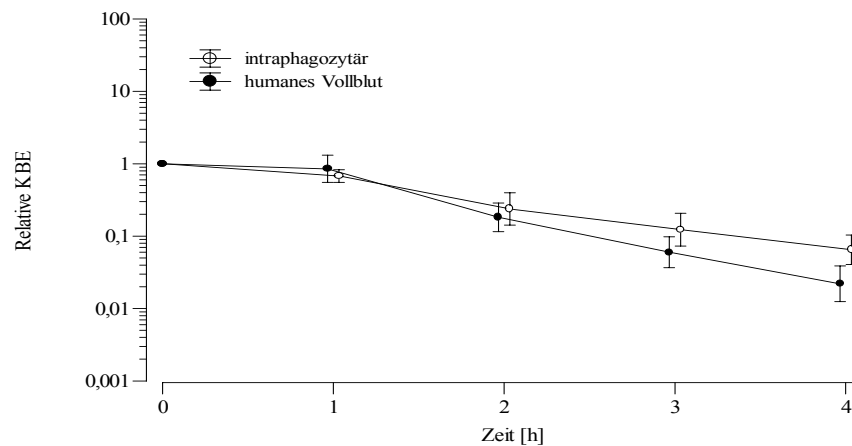


Abb. 5.3.2.3.3. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Moxifloxacin gegen *E. faecalis* (Mittel aus 2 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.2.4. *Enterococcus faecium*

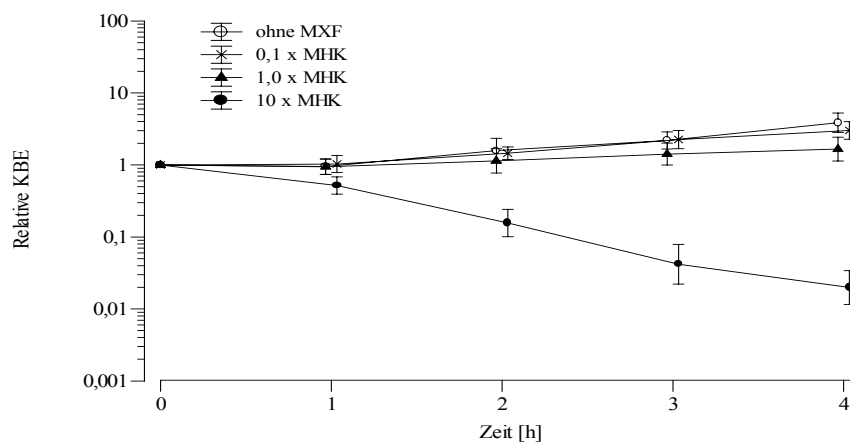


Abb. 5.3.2.4.1. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *E. faecium* BM 4147 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=1,5 µg/ml)

Eine deutliche Aktivität von Moxifloxacin ist erst in einer Konzentration der zehnfachen MHK zu erkennen. Es kommt zur Reduktion des Inokulums um ca. 85 %.

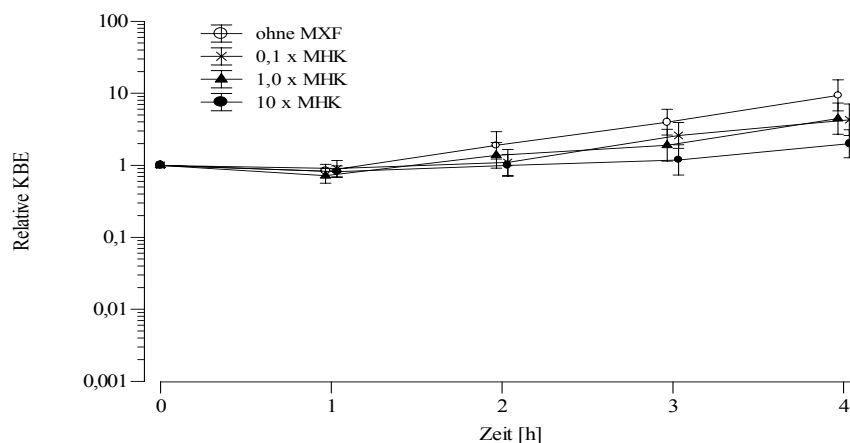


Abb. 5.3.2.4.2. Bakterizidie-Kinetik von Moxifloxacin gegenüber intrazellulären *E. faecium* 14758/99 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

Bei *E. faecium* 14758/99 wird selbst bei Zugabe der zehnfachen MHK Moxifloxacin keine Wirkung erzielt, sondern es kommt innerhalb von vier Stunden zur Verdopplung der Anzahl an KBE.

Die beiden untersuchten *E. faecium*-Stämme vermehren sich intraphagozytär innerhalb von vier Stunden etwa um das zehnfache. Eine Reduktion der Keimzahl ist mit Moxifloxacin nur gegen *E. faecium* BM 4147 bei Zugabe der zehnfachen MHK zu erkennen. Es werden ca. 85 % der KBE abgetötet.

In humanem Vollblut hingegen wird die Einsaat innerhalb von vier Stunden um 90 % - 99 % reduziert (siehe Kap. 5.2.2.5.).

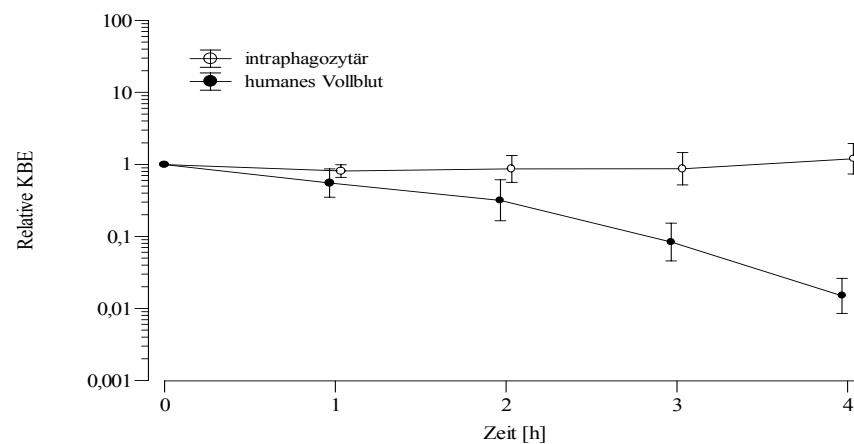


Abb. 5.3.2.4.3. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Moxifloxacin gegen *E. faecium* (Mittel aus 2 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.3.LINEZOLID

5.3.3.1.*Staphylococcus aureus*

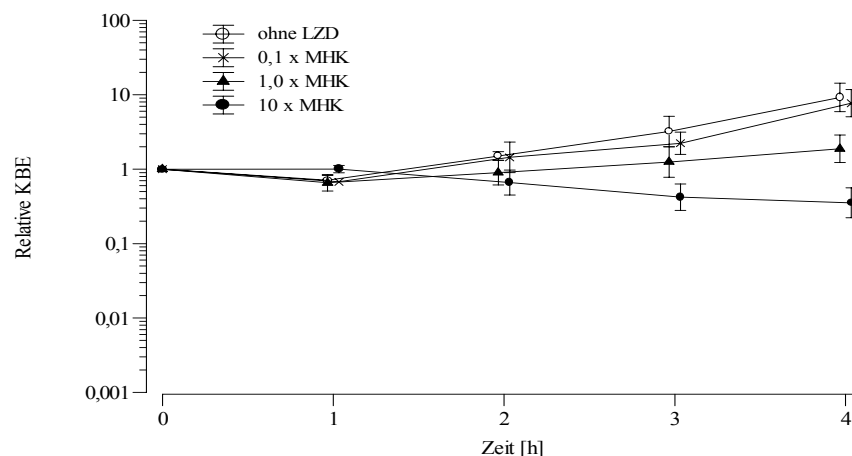


Abb. 5.3.3.1.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *S. aureus* ATCC 25923 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

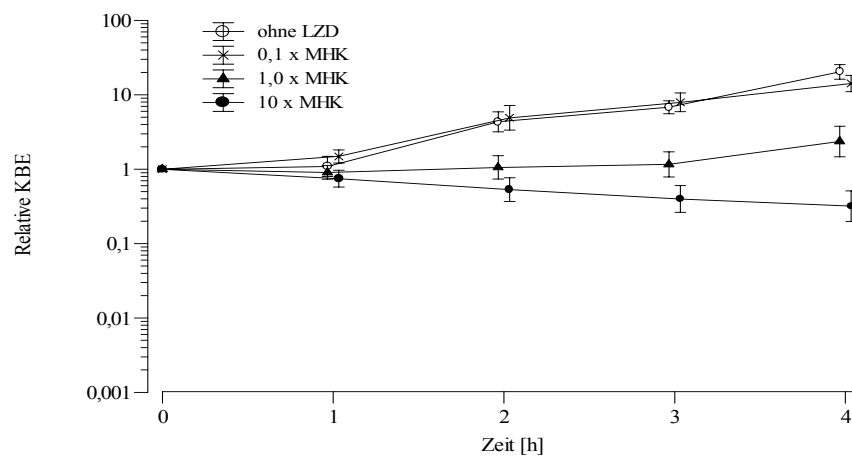


Abb. 5.3.3.1.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *S. aureus* 1538/00 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

Bei Zugabe der einfachen MHK Linezolid tritt bei *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* 1538/00 ein subinhibitorischer Effekt ein. In zehnfacher MHK wirkt Linezolid bakteriostatisch.

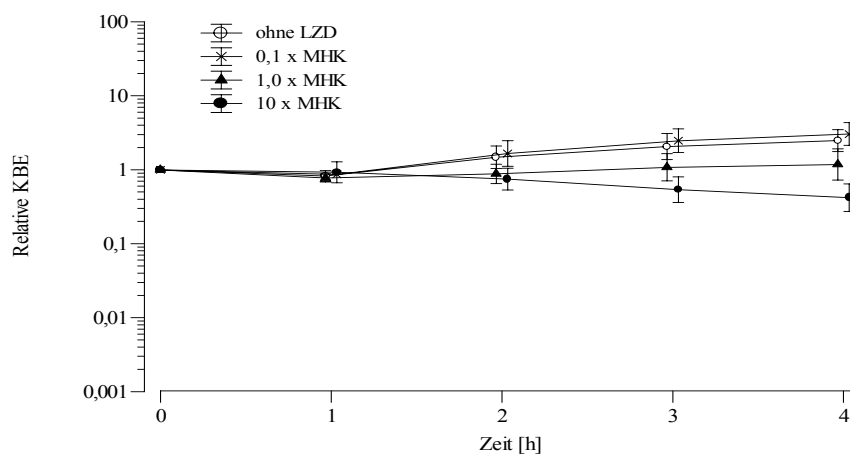


Abb. 5.3.3.1.3. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *S. aureus* 2394/00 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

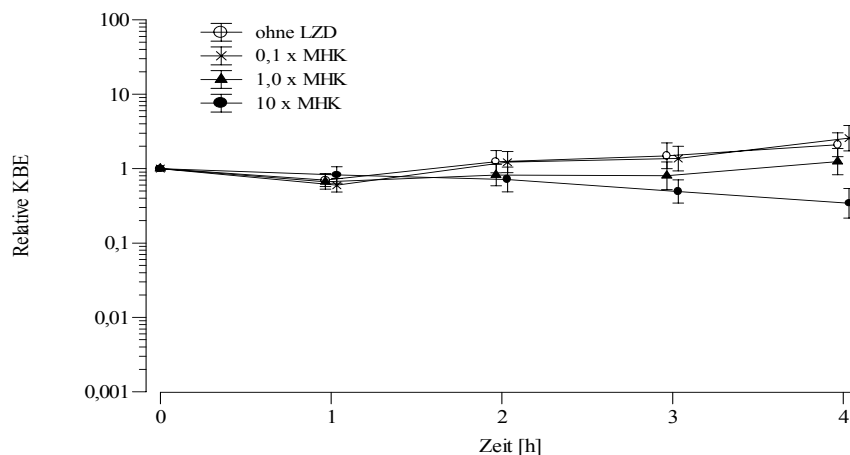


Abb. 5.3.3.1.4. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *S. aureus* MRSA ND (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

Bei *S. aureus* 2394/00 und dem MRSA ND wirkt die zehnfache MHK Linezolid bakteriostatisch.

Alle getesteten Staphylokokken wachsen intraphagozytär um etwa eine \log_{10} Stufe innerhalb von vier Stunden aus.

Bei Zugabe der einfachen MHK Linezolid zeigt sich ein subinhibitorischer Effekt. Die zehnfache MHK wirkt bakteriostatisch.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Versuchen der Bakterizidie-Kinetik in Vollblut (siehe Kap. 5.2.3.1.), so stellt man keinen Unterschied in der Aktivität von Linezolid fest.

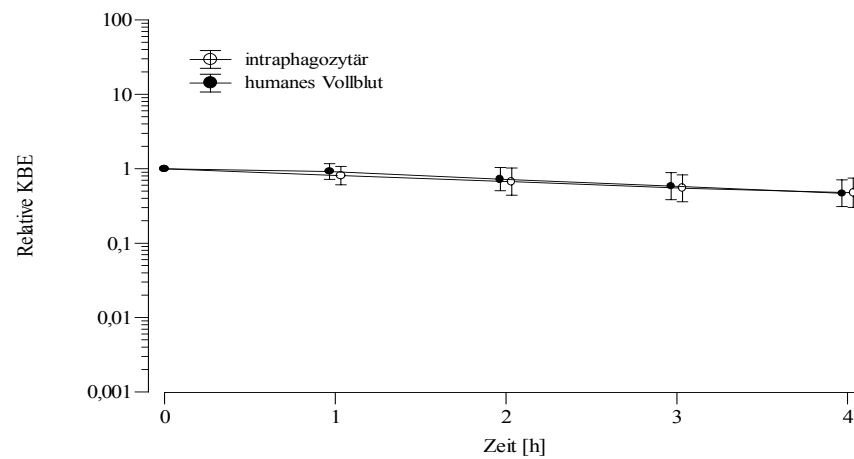


Abb. 5.3.3.1.5. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Linezolid gegen *S. aureus* (Mittel aus 4 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.3.2. *Enterococcus faecalis*

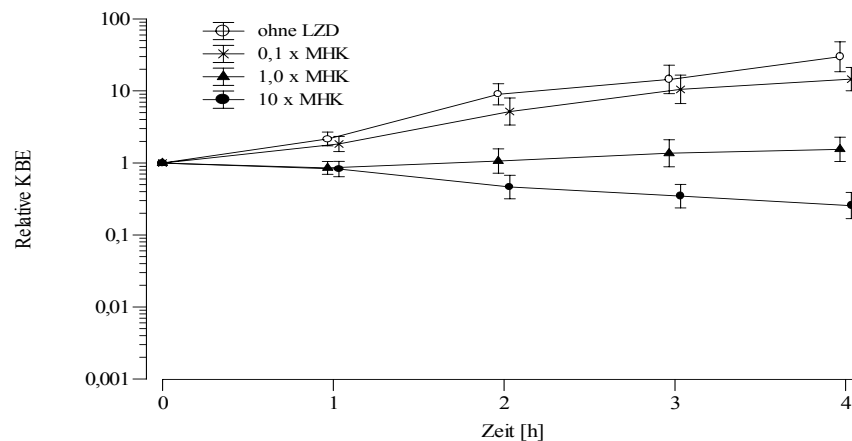


Abb. 5.3.3.2.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *E. faecalis* ATCC 29212 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

Bei Zugabe der einfachen MHK oder zehnfachen MHK Linezolid wird gegen *E. faecalis* ATCC 29212 ein bakterioistatischer Effekt erzielt.

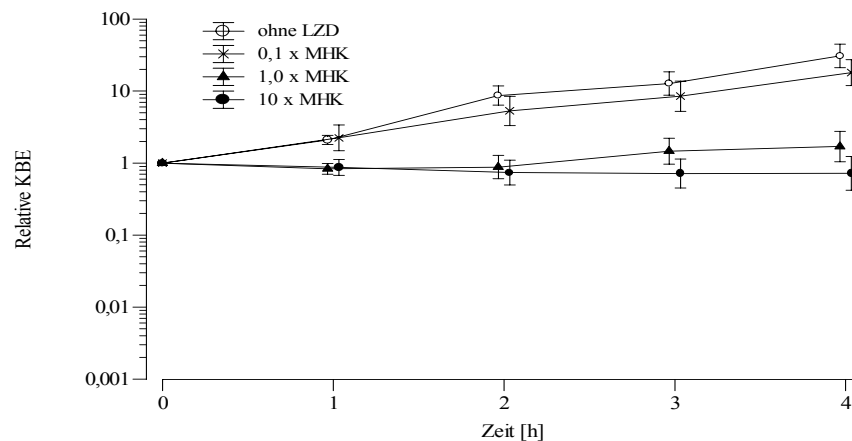


Abb. 5.3.3.2.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *E. faecalis* VS 83 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=2,0 µg/ml)

Mit der einfachen MHK oder zehnfachen MHK zeigt sich auch gegen den *E. faecalis* VS 83-Stamm eine bakterioistatische Aktivität.

Die beiden untersuchten *E. faecalis*-Stämme wachsen in den Granulozyten innerhalb von vier Stunden um etwa eine \log_{10} -Stufe aus. Bei den Bakterizidie-Versuchen in Bouillon bzw. Vollblut waren es zwei \log_{10} -Stufen.

Bei Zugabe der 0,1-fachen MHK Linezolid zeigt sich keine Aktivität. Verwendet man die einfache MHK wird ein bakteriostatischer Effekt erzielt.

Mit der zehnfachen MHK wird das Inokulum um 50 % bei *E. faecalis* ATCC 29212 und um 10 % bei *E. faecalis* VS 83 innerhalb der Versuchsdauer reduziert.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Versuche zur Bakterizidie-Kinetik werden intraphagozytär weniger Keime abgetötet als in Vollblut im gleichen Zeitraum. Intraphagozytär sind es durchschnittlich 60 %, in Vollblut hingegen 75 % (siehe 5.3.3.2.3.).

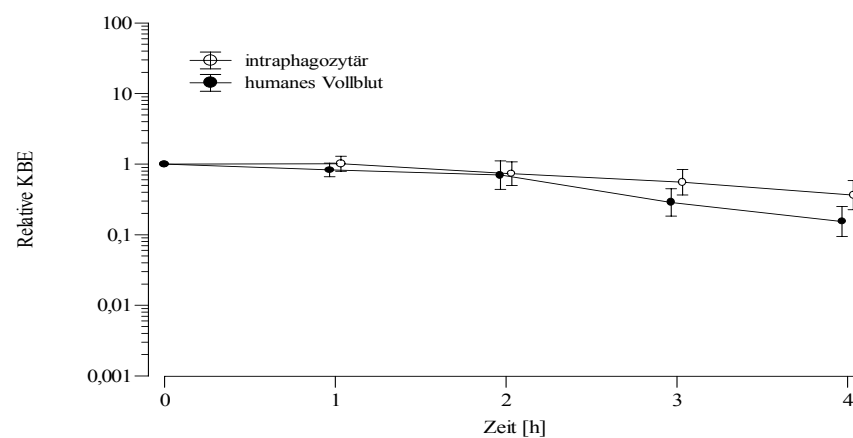


Abb. 5.3.3.2.3. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10 x MHK Linezolid gegen *E. faecalis* (Mittel aus 2 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.3.3.3. *Enterococcus faecium*

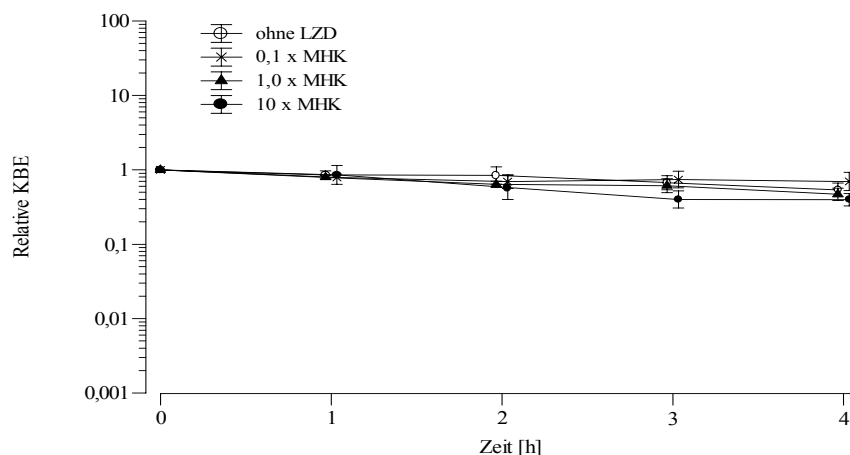


Abb. 5.3.3.3.1. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *E. faecium* BM 4147 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=4,0 µg/ml)

E. faecium BM 4147 zeigt keinerlei intraphagozytäre Vermehrung. Es kommt in jedem Fall, ganz gleich ob mit Antibiotika oder ohne, zu einer Keimreduktion von ca. 30 % - 40 % innerhalb von vier Stunden.

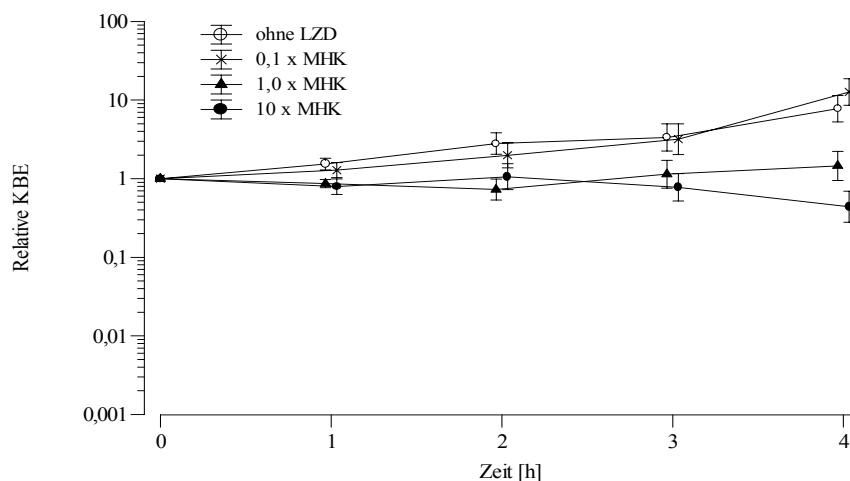


Abb. 5.3.3.3.2. Bakterizidie-Kinetik von Linezolid gegenüber intrazellulären *E. faecium* 14758/00 (Mittel aus 3 Versuchen, MHK=1,0 µg/ml)

E. faecium 14758/99 wächst intraphagozytär innerhalb des Versuchszeitraums um etwa eine log₁₀-Stufe aus. Mit der einfachen MHK wird eine bakteriostatische Wirkung erzielt, mit der zehnfachen MHK wird das Inokulum halbiert.

Werden die Ergebnisse der Phagozytose-Versuche mit denen der Bakterizidie-Kinetik in humanem Vollblut verglichen, so ist festzustellen, dass in Vollblut mehr Keime im gleichen Zeitraum abgetötet werden. Bei den intraphagozytären Bakterien wird das Inokulum um 55 % bei *E. faecium* BM 4147 und um 45 % bei *E. faecium* 14758/99 reduziert. Bei den Versuchen zur Bakterizidie-Kinetik erfolgt eine Reduktion des Inokulums um 64 % bzw. 52 % (siehe 5.3.3.3.3.).

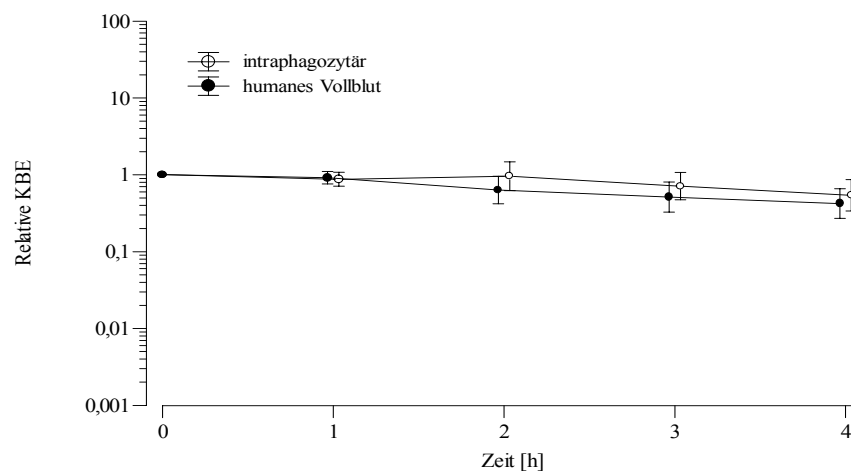


Abb. 5.3.3.3.3. Vergleich der Bakterizidie-Kinetik von 10xMHK Linezolid gegen *E. faecium* (Mittel aus 2 Stämmen) in humanem Vollblut und intraphagozytär

5.4. TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In dieser Arbeit werden zwei bei Beginn der Studie nicht untersuchte Fragenkomplexe zur Wirksamkeit von Antibiotika einer experimentellen Prüfung unterzogen:

1. die Aktivität von verschiedenen Antibiotika in Isosensitest-Bouillon im Vergleich zu humanem Blut
2. die intrazelluläre Aktivität von Moxifloxacin und Linezolid gegen *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium*

Die Ergebnisse werden tabellarisch zusammengefasst und im Folgenden dargestellt.

Tabelle 5.4.1.: Vergleich der Aktivität der untersuchten Antiinfektiva in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut

	ohne Antiinfektiva		einfache MHK		10-fache MHK	
	Bouillon	Blut	Bouillon	Blut	Bouillon	Blut
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-sensibel)	+	++				
Penicillin G			--	±	--- (4 h)	--
Moxifloxacin			-	±	--- (5 h)	--
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-resistent)	+	++				
Penicillin G			-	+	--	-
Moxifloxacin			+	±	--- (4,5 h)	--
<i>S. aureus</i> (Methicillin-sensibel)	++	+				
Moxifloxacin			+ (ATCC: --)	±	--- (4 - 6 h)	--
Linezolid			±	±	±	±
Oxacillin			±	±	--	-
Cefuroxim			±	±	±	-
<i>S. aureus</i> MRSA ND (Methicillin-resistent)	+	+				
Moxifloxacin			--- (5 h)	±	--- (3 h)	--- (5 h)
Linezolid			--	-	±	±
<i>E. faecalis</i>	++	+				
Moxifloxacin			+	±	--- (3 h)	--- (5 h)
Linezolid			±	±	±	±
<i>E. faecium</i>	++	++				
Moxifloxacin			BM4147: --- (4,5 h) 14758/00: +	±	--- (2 - 6 h)	BM4147: --- (4 h) 14758/00: --
Linezolid			±	±	±	±

--- : Bakterizidie, Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 3 log₁₀-Stufen (Zeit in Stunden)

-- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

± : Vermehrung oder Reduktion der Anzahl an KBE um maximal 1 log₁₀-Stufe

+ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

++ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

Tabelle 5.4.2.: Vergleich der intrazellulären Aktivität der untersuchten Antiinfektiva

	ohne Antiinfektiva intrazellulär	einfache MHK intrazellulär	10-fache MHK intrazellulär
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-sensibel)	±		
Moxifloxacin		±	--- (3 h)
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-resistent)	±		
Moxifloxacin		±	-
<i>S. aureus</i> (Methicillin-sensibel)	+		
Moxifloxacin		±	-
Linezolid		±	±
<i>S. aureus</i> MRSA ND (Methicillin-resistent)	±		
Moxifloxacin		±	±
Linezolid		±	±
<i>E. faecalis</i>	+		
Moxifloxacin		±	-
Linezolid		±	±
<i>E. faecium</i>	±		
Moxifloxacin		±	BM4147: - 14758/00: ±
Linezolid		±	±

--- : Bakterizidie, Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 3 log₁₀-Stufen (Zeit in Stunden)

-- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

± : Vermehrung oder Reduktion der Anzahl an KBE um maximal 1 log₁₀-Stufe

+ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

++ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

Tabelle 5.4.3.: Vergleich der Aktivität in Blut mit der intrazellulären Aktivität der untersuchten Antiinfektiva

	ohne Antiinfektiva Blut	10-fache MHK Blut	ohne Antiinfektiva intrazellulär	10-fache MHK intrazellulär
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-sensibel)	++		±	
Moxifloxacin		--		--- (3 h)
<i>S. pneumoniae</i> (Penicillin-resistent)	++		±	
Moxifloxacin		--		-
<i>S.aureus</i> (Methicillin-sensibel)	+		+	
Moxifloxacin		--		-
Linezolid		±		±
<i>S.aureus</i> MRSA ND (Methicillin-resistent)	+		±	
Moxifloxacin		--- (5 h)		±
Linezolid		±		±
<i>E. faecalis</i>	+		+	
Moxifloxacin		--- (5 h)		-
Linezolid		±		±
<i>E. faecium</i>	++		±	
Moxifloxacin		BM4147: --- (4 h) 14758/00: --		BM4147: - 14758/00: ±
Linezolid		±		±

--- : Bakterizidie, Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 3 log₁₀-Stufen (Zeit in Stunden)

-- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

- : Reduktion der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

± : Vermehrung oder Reduktion der Anzahl an KBE um maximal 1 log₁₀-Stufe

+ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 1 log₁₀-Stufe

++ : Vermehrung der Anzahl an KBE um mindestens 2 log₁₀-Stufen

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird die nährmedienabhängige Wirkung einiger Antiinfektiva gegen verschiedene Isolate der gram-positiven Bakterienspezies *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* untersucht. Weiterhin wird die Wirkung von Moxifloxacin und Linezolid gegen intrazellulär in humanen Granulozyten vorliegende Keime dieser Spezies getestet.

Um die Datengrundlage für die Versuche zur Bakterizidie-Kinetik in verschiedenen Nährmedien sowie für die Testreihen zur intrazellulären Aktivität von Moxifloxacin und Linezolid zu schaffen, werden zunächst die minimalen Hemmkonzentrationen und minimalen bakteriziden Konzentrationen der verwendeten Antibiotika gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen in Bouillon bestimmt. Hierbei werden zur Qualitätssicherung die Kontrollstämme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in die Empfindlichkeitsprüfung einbezogen. Die für diese Stämme ermittelten Werte stimmten mit den Vorgaben gemäß NCCLS M07-A5 [86] überein.

Mit Ausnahme des *S. aureus* MRSA „Norddeutsch“ sind alle getesteten Bakterienisolate empfindlich gegenüber Moxifloxacin, unabhängig von einer vorliegenden Resistenz für andere Antiinfektiva. Ebenso sind alle untersuchten Staphylokokken und Enterokokken sensibel gegenüber Linezolid. Dies gilt auch für die Stämme, die resistent gegen Vancomycin oder β -Lactam Antibiotika sind. Diese Ergebnisse bestätigen eine Vielzahl früherer Studien mit anderen Isolaten dieser Spezies [Al Nawas 2, Berrington 7, Cuny 23, v.Eiff 33, Jones 58, Kayser 60, Klugmann 65, Malathum 79, Patel 92, Reinert 97]. Jedoch gibt es in neuerer Zeit vereinzelt auch Berichte von Moxifloxacin-resistenten [Fass 37, Hardy 44] und Linezolid-resistenten [Herrero 48, Zurenko 121] *E. faecium*-Stämmen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Testreihen wirkt Penicillin G in zehnfacher MHK auf sensible *S. pneumoniae*-Stämme bakterizid, gegen Penicillin-resistente Stämme - trotz Zugabe von mehr Wirkstoff - nur bakteriostatisch. Die beiden anderen untersuchten β -Lactam Antibiotika, Oxacillin und Cefuroxim, wirken bakteriostatisch auf die getesteten *S. aureus* Isolate. Alle drei β -Lactam Antibiotika haben sowohl eine zeitabhängige wie auch konzentrationsabhängige Aktivität [Johansen 55].

Das Fluorochinolon Moxifloxacin hat gegen alle hier untersuchten Bakterienisolate in Bouillon eine konzentrationsabhängige bakterizide Aktivität. Moxifloxacin wirkt gegen die untersuchten Isolate, besonders gegen Penicillin-resistente *S. pneumoniae*-Stämme, schneller bakterizid als alle anderen getesteten Substanzen. Diese Eigenschaft macht es zu einer bedeutenden Alternative bei der Behandlung von Infektionen der Atemwege. Auch gegen die untersuchten *S. aureus* - Isolate hat Moxifloxacin eine hohe Aktivität (0,06 $\mu\text{g/ml}$). Die minimale Hemmkonzentration für den MRSA-Stamm war mit 4,0 $\mu\text{g/ml}$ erhöht, liegt aber noch innerhalb der therapeutischen Breite. Somit ist Moxifloxacin ein hervorragendes Präparat zur Behandlung von oft schwer beherrschbaren durch *S. aureus* verursachte Wundinfektionen.

Linezolid zeigt im Gegensatz zu den β -Lactamen und den Fluorochinolonen - unabhängig, ob die einfache oder zehnfache MHK eingesetzt wird - lediglich eine bakteriostatische Wirkung. Dieses Antibiotikum kommt vor allem gegen Infektionen mit MRSA-Stämmen oder Vancomycin-resistenten Enterokokken zum Einsatz. In Übereinstimmung mit seinem klinischen Einsatz ist Linezolid wirksam gegen den in dieser Studie untersuchten MRSA-Stamm sowie gegen das getestete Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolat.

Insgesamt sind die in dieser Arbeit durchgeführten vorbereitenden Untersuchungen in guter Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Angaben in der Literatur und der allgemeinen Lehrmeinung [Bostic 9, Boswell 11, Dalhoff 24-25, Esposito 35, Gradelski 42, Klugmann 64-65, Malathum 79, Rybak 103, Seral 105, Simon 110, Wise 118, Zurenko 120, 122]. Auf dieser Grundlage werden die folgenden neuen Experimente durchgeführt.

6.1. BAKTERIZIDIE-KINETIK IN ABHÄNGIGKEIT DES NÄHRMEDIUMS

Bei den Untersuchungen zur Keimvermehrung in Isosensitest-Bouillon und humanem Blut ist die Proliferation der *S. pneumoniae*-, *S. aureus*- und Enterokokken-Stämme etwa vergleichbar. Lediglich die Adaptationszeit ist in Blut etwas verlängert. Dennoch wachsen die Bakterien auch in diesem Medium innerhalb der ersten 6 - 8 Stunden um ein bis zwei \log_{10} -Stufen aus, so dass ein Beobachtungszeitraum von 6 Stunden gewählt wird, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.

Weiterhin wird die Aktivität der Antiinfektiva in humanem Blut und Schafsblut verglichen. Die Ergebnisse weisen nur geringe Unterschiede auf, so dass es grundsätzlich möglich wäre, solche Untersuchungen in Schafsblut durchzuführen. Das hätte den Vorteil, dass die Ergebnisse besser vergleichbar wären, da man immer das Blut ein und desselben Schafes nehmen könnte, während man das humane Blut von verschiedenen Probanden verwenden muss.

Bei einem Vergleich der Versuchsreihen in Bouillon mit denen in Blut zeigen sich Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Antiinfektiva.

Bei einfacher MHK haben Moxifloxacin, Penicillin G und Oxacillin in Bouillon eine deutlich größere Aktivität als in Blut. Bei Versuchen mit der jeweiligen 10-fachen MHK wird der Aktivitätsverlust in Blut noch deutlicher. Die Reduktion des Inokulums ist in Bouillon größer und erfolgt schneller (Tabelle 5.4.1.).

Dieser Aktivitätsverlust der betrachteten Antibiotika könnte darauf zurückzuführen sein, dass bestimmte Komponenten des Blutes, beispielsweise die Plasmaproteine, verschiedene Xenobiotika, unter anderem auch Antibiotika, zu binden vermögen. Es wurde in früheren Studien nachgewiesen, dass proteingebundene Antibiotikamoleküle ihre Aktivität verlieren [Boswell 12, Collignon 22, Lacey 74, Moretti 82]. Einen deutlichen Aktivitätsverlust bei zehnfacher MHK weist in den durchgeführten Versuchsreihen beispielsweise Oxacillin auf. Es hat mit etwa 93 % die höchste Plasmaproteinbindung. Bei Moxifloxacin (ca. 40 % Eiweißbindung) und Penicillin G (ca. 50 % Eiweißbindung) ist der Aktivitätsverlust nicht so groß.

Die Wirksamkeit von Cefuroxim und Linezolid ist sowohl in Bouillon wie auch in Blut etwa vergleichbar. Bei beiden Antibiotika ist die Aktivität in humanem Blut etwas größer als in Isosensitest-Bouillon. Cefuroxim wirkt als Cephalosporin auf sich in der Teilungsphase befindende Keime bakterizid und hat somit einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Penicillin G. Es wirkt in Blut besser und schneller als in Bouillon. Es vermag die Anzahl an KBE/ml der getesteten Staphylokokken in Blut innerhalb von 6 Stunden um ca. 90 % zu reduzieren. In Bouillon wird hingegen nur für *S. aureus* ATCC 25923 eine Reduktion des Inokulums von 90 % innerhalb von 24 h erreicht. Linezolid hat aufgrund seines Wirkmechanismus nur bakteriostatische Aktivität [Andes 4, Bostic 9, Rybac 103]. Diese ist über einen Zeitraum von 24 Stunden betrachtet in Blut größer als in Bouillon. Cefuroxim und Linezolid verfügen mit 20 % bzw. 31 % über eine sehr geringe Plasmaproteinbindung, d.h. es ist in Blut mehr freie und somit aktive Substanz vorhanden im Vergleich zu Moxifloxacin oder Penicillin G. Da Isosensitest-Bouillon und Blut nahezu den gleichen pH-Wert haben (Blut 7,4 und Isosensitest-Bouillon 7,3) ist ein möglicherweise hieraus resultierender Einfluss auszuschließen [Naber 84].

In der Literatur sind bereits für andere Antiinfektiva nährmedienabhängige Aktivitätsänderungen beschrieben [Andrews 5, Boswell 12, Helm 45-46, Johnson 56, King 62, Lamp 75, Naber 84, Nagl 85, Rubinstein 102, Seral 105, Shah 107-109, Woodcock 119]. Ein Vergleich der Wirksamkeit von Penicillin G, Moxifloxacin, Linezolid, Oxacillin und Cefuroxim in Bouillon und Blut ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. In dieser Arbeit wird ein Aktivitätsverlust in Blut im Vergleich zu Isosensitest-Bouillon für Moxifloxacin, Penicillin G und Oxacillin beobachtet. Hingegen ist die Aktivität von Linezolid und Cefuroxim in humanem Blut größer als in Bouillon.

Die Ergebnisse der untersuchten Antiinfektiva zeigen Wirkunterschiede in Bouillon, wie sie bei *in-vitro* Versuchen Verwendung findet, und Blut, das einen Teil der *in-vivo* Bedingungen darstellt. Da der Behandlungserfolg von der Aktivität eines Antibiotikums am Wirkort abhängt, sollte die Aktivität im entsprechenden Nährmedium getestet werden, um einem möglichen Therapieversagen vorzubeugen. Man könnte Antibiotika dann nicht nur nach der MHK gegen den isolierten Erreger sondern auch nach der Aktivitätsveränderung am Wirkort beurteilen.

6.2. INTRAZELLULÄRE AKTIVITÄT

Ein Kriterium für die Wirksamkeit von Antiinfektiva ist ihre Aktivität in Phagozyten [Tulkens 115-116], da einige Keime, die als potentielle Infektionserreger gelten, intrazellulär überleben und sich dort sogar vermehren können. Durch Einschleusen der Erreger in Granulozyten soll die Wirksamkeit der verschiedenen Antibiotika unter möglichst natürlichen Bedingungen an einem Modell untersucht werden.

Die getesteten *S. pneumoniae*-Stämme weisen eine schlechte intrazelluläre Überlebensfähigkeit auf. Bei der zunächst vorgesehenen Opsonisierungs- und Phagozytosezeit von je $\frac{1}{4}$ Stunde werden nicht genügend Keime in die Granulozyten aufgenommen. Außerdem kommt es auch ohne Zugabe von Antibiotikum zu einer raschen Keimreduktion. Um dennoch die intrazelluläre Aktivität gegen Pneumokokken bestimmen zu können wird die Opsonisierungs- und Phagozytosezeit auf je $\frac{1}{2}$ Stunde verlängert. Eine Vermehrung in den Granulozyten ist aber auch hierbei nicht zu beobachten. Dennoch zeigen die durchgeführten Versuche deutlich die intrazelluläre Wirkung von Moxifloxacin. Die 10-fache MHK tötet die phagozytierten Pneumokokken innerhalb von etwa 3 Stunden um etwa drei \log_{10} -Stufen ab, während sich die Keimzahl innerhalb von 4 Stunden ohne Zugabe eines Antiinfektivums nicht verringert.

Bei den getesteten Staphylokokken und Enterokokken ist die Keimvermehrung nach Phagozytose durch Granulozyten deutlich verzögert. Während in Bouillon innerhalb der ersten vier Stunden eine Vermehrung von fast 2 \log_{10} -Stufen erreicht wird, beschränkt sich die Zunahme der KBE intrazellulär auf weniger als eine \log_{10} -Stufe. Die Bakterien müssen sich zunächst an das veränderte Milieu anpassen. Außerdem werden sie in den Zellen vermutlich einer Reihe von Abwehrmechanismen ausgesetzt. Beides führt möglicherweise zu einer Verzögerung des Eintritts in die logarithmische Wachstumsphase.

Lange Zeit wurde vermutet, dass die intrazelluläre Anreicherung von Antibiotika im Zusammenhang steht mit ihrer intrazellulären Aktivität [v.d.Broeck 14-15, Tulkens 116]. Einige Autoren haben jedoch in verschiedenen Experimenten gezeigt, dass es keine direkte Korrelation zwischen der Akkumulation und der intrazellulären Aktivität von Antiinfektiva, wie z.B. den Fluorochinolonen, gibt [Al-Nawas 2, Garcia 38-39, Nielsen 88, Paillard 89, Pascual 90-91]. Obwohl Paillard et al. gezeigt haben, dass sich Moxifloxacin in infizierten THP-1 Monozyten um das etwa 6-fache anreichert, ist die intrazelluläre Aktivität vergleichsweise schlecht. Bei seinen Versuchsreihen wurde die doppelte MHK extrazellulär benötigt, um eine intrazelluläre Reduktion der Keimzahl von 2,5 bis 3 \log_{10} -Stufen zu erreichen [Paillard 89].

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Aktivität von Moxifloxacin in Granulozyten gegen mehrere Staphylokokken- und Enterokokken-Isolate untersucht. Die extrazellulär vorhandene 10-fache MHK von Moxifloxacin führt zu einer Reduktion des Inokulums um maximal 95 %. Es ist somit lediglich Bakteriostase und keine bakterizide Aktivität zu beobachten. Ein extremes Beispiel für diese Art von Wirkungsverlust stellt der untersuchte *E. faecium* 14758/99 dar, ein Isolat eines Septikämie-Patienten. Er vermehrt sich intrazellulär trotz einer extrazellulär vorhandenen 10-fachen MHK Moxifloxacin. Bei den getesteten phagozytierten *S. aureus*-Stämmen hingegen ist bei Vergleich der intrazellulären Aktivität mit der in humanem Vollblut nur ein geringer Wirkungsverlust festzustellen. Dieser Aktivitätsunterschied ist bei den *E. faecium*-Stämmen größer. Intrapagozytär vermehren sich deren Keime um etwa eine \log_{10} -Stufe, während sie in humanem Blut im gleichen Zeitraum um eine \log_{10} -Stufe reduziert werden (Abb. 5.3.2.4.3). Obwohl beide Bakterienarten im gleichen intrazellulären Kompartiment vorliegen [Carlier 17, Tulkens 115], zeigen sich in dieser Arbeit doch Unterschiede in der Wirksamkeit von Moxifloxacin gegen die getesteten Isolate.

Die abgeschwächte intrazelluläre Aktivität von Moxifloxacin ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt. Das Penetrationsvermögen eines Antiinfektivums in Granulozyten ist alleine kein Garant für eine gute intrazelluläre Aktivität. Zur Phagozytose befähigte Zellen bestehen aus zahlreichen Zellkompartimenten mit unterschiedlichen chemischen Milieus. Ebenso müssen die Antiinfektiva mit den Bakterien im gleichen Zellkompartiment vorliegen, um ihre Wirkung entfalten zu können. Intrazellulär liegt die Bakteriendichte bei mehr als 10^7 KBE/ml [Paillard 89]. Paillard et al. zeigen für *S. aureus* ATCC 25923, dass bei Erhöhung der Bakteriendichte von 10^5 KBE/ml (MHK-Bestimmung gemäß NCCLS) auf 10^7 KBE/ml die MHK für Moxifloxacin um eine Verdünnungsstufe von 0,25 g/ml auf 0,5 µg/ml ansteigt [Paillard 89]. Antiinfektiva benötigen bestimmte Umgebungskriterien, z.B. bestimmte pH-Werte, um eine gute Aktivität zu erzielen. In saurem Milieu von etwa pH 5,0, wie es im Phagolysosom herrscht, steigt der MHK-Wert für Moxifloxacin um zwei Titerstufen an im Vergleich zur MHK in Bouillon mit einem pH-Wert von 7,3 [Seral 105]. Im intrazellulären phagolysosomal Kompartiment muss demnach eine höhere Wirkstoffkonzentration vorliegen, um eine vergleichbare Aktivität wie in Bouillon zu erreichen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich Bakterien in Kompartimenten der Zelle aufhalten, die bestimmten Antiinfektiva nicht zugänglich sind [v.d.Broeck 14, Carlier 17, Garcia 38-39, Herrera-Insua 47, Hof 51, Paillard 89, Schwab 104, Tulkens 115-116]. Es ist aber auch denkbar, dass Antibiotika von Proteinen oder anderen Zytosolbestandteilen gebunden werden und so ihre Aktivität verlieren [Seral 105]. Auch das beobachtete verspätete Eintreten der Bakterien in die logarithmische Wachstumsphase hat einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Antiinfektiva [Eng 34, Lamp 75].

Für Linezolid gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität gegen intrazelluläre Staphylokokken oder Enterokokken in Gegensatz zur Aktivität in humanem Vollblut (Kapitel 5.2.3., 5.3.3.). Bislang gibt es keine Literaturangaben, wie sich Linezolid bei intrazellulären bakteriellen Infektionen verhält. Die in dieser Arbeit festgestellte gute intrazelluläre Aktivität lässt auf günstige chemische Eigenschaften für eine Zellpenetration und intraphagozytäre Aktivität schließen. Ein Faktor könnte die lipophile Molekülstruktur des Linezolid sein, eine Eigenschaft, die die Penetration in eine Zelle begünstigt. Des Weiteren handelt es sich bei Linezolid um eine schwache Base. Da das intrazelluläre Milieu eines infizierten Granulozyten sauer ist – ein Phagolysosom hat einen pH-Wert von 5 [Seral 105] – kann dieser Wirkstoff wahrscheinlich in der Zelle akkumulieren. Als bakteriostatische Substanz ist die Anreicherung jedoch nur begrenzt von Vorteil. Ist die Konzentration für die Aktivität erreicht, bringt eine zusätzliche Anreicherung keinen weiteren Nutzen. Insgesamt sprechen die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse für eine gute intrazelluläre Aktivität von Linezolid.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der zuvor nicht bekannten Beeinflussung der Aktivität von bestimmten Antibiotika durch unterschiedliche Testnährmedien. Zu diesem Zweck wird die Aktivität von Moxifloxacin, Linezolid, Penicillin G, Oxacillin und Cefuroxim gegen Bakterienisolate der Spezies *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis* und *E. faecium* in Bouillon und Blut getestet. Des Weiteren wird die Aktivität von Moxifloxacin und Linezolid gegen intrazellulär in humanen Granulozyten vorliegende Bakterienisolate der oben genannten Spezies geprüft.

Die Ergebnisse und daraus folgende Empfehlungen lauten wie folgt:

1. Moxifloxacin und Linezolid haben eine gute Aktivität gegen die in dieser Studie untersuchten Bakterienisolate, unabhängig von der Empfindlichkeit oder Resistenz dieser Isolate gegen andere Antiinfektiva. Diese neuen Antibiotika könnten somit zur Behandlung von Infektionen mit Erregern der Spezies *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* zum Einsatz kommen.
2. Die Aktivität eines Antibiotikums kann in Bouillon und in Vollblut unterschiedlich sein. Moxifloxacin, Penicillin G und Oxacillin haben in Bouillon eine größere Aktivität als in Vollblut. Die Wirksamkeit von Linezolid und Cefuroxim sind sowohl in Bouillon als auch in Blut etwa vergleichbar. Da der Behandlungserfolg von der Aktivität eines Antibiotikums am Wirkort abhängt, sollte die Aktivität im entsprechenden Nährmedium getestet werden, um einem möglichen Therapieversagen vorzubeugen.
3. Moxifloxacin und Linezolid haben eine Wirksamkeit gegen intrazellulär in Granulozyten vorliegende *S. aureus* und Enterokokken-Isolate. Deshalb könnten sowohl Moxifloxacin als auch Linezolid für die Therapie von Infektionen mit intrazellulär vorliegenden *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* dienen. Bei Verwendung von Moxifloxacin muss jedoch der intrazelluläre Aktivitätsverlust berücksichtigt werden und daher eine höhere Dosierung verabreicht werden.

8. SUMMARY

IN-VITRO ACTIVITY OF MOXIFLOXACIN AND LINEZOLID AGAINST ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AND ENTEROCOCCI AND IST DEPENDENCE ON THE TEST MEDIUM AND THE SITE OF THE BACTERIA

The objective of this study is to evaluate the influence of different test media on the activity of antiinfectives. Therefore, the activity of moxifloxacin, a new fluoroquinolon, linezolid, a new oxazolidinon, penicillin G, cefuroxim and oxacillin against isolates of *S. aureus*, *S. pneumoniae* and enterococci in different media such as broth and blood is determined. Furthermore, the activity of these antibiotics against intracellular bacteria is investigated.

The results and conclusions are as follows:

1. Moxifloxacin and Linezolid show good activity against the investigated bacterial isolates. The MIC-values are not influenced by resistance to other antiinfectives. Therefore, these new antibiotics could be taken for treating infections caused by *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. faecium*.
2. The activity of antibiotics could be influenced by the test medium. For Moxifloxacin, Penicillin G and Oxacillin, there is an decrease in activity in blood compared to that in broth. Because the sucess of treatment depends on the activity of the antiinfective at the infection site, the MIC-testing should be carried out in the appropriate test medium.
3. Moxifloxacin and Linezolid demonstrate activity against strains of *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis* and *E. faecium* ingested by granulocytes. Therefore, Moxifloxacin as well as Linezolid could be taken for treating infections caused by intracellular isolated of these species. Concerning Moxifloxacin, a higher dosage should be taken because of the lower intracellular activity.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Al Nawas B.**
Die intrazelluläre Wirkung von Makrolidantibiotika.
Dissertation, Frankfurt am Main 1993.
2. **Al-Nawas B., Shah P.M.**
Intracellular activity of ciprofloxacin and moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
J. Antimicrob. Chemother. 1993; 41:655-658.
3. **Al-Nawas B., Shah P.M.**
Intracellular activity of vancomycin and Ly333328, a new semisynthetic glycopeptide, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
Infection 1998; 26:165-167.
4. **Andes D., Ogtrop M.L.v., Peng J., Craig W.A.**
In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid).
Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:3484-3489.
5. **Andrews J.M. for the BSAC Working Party on Sensitivity Testing.**
Effect of medium composition on the MIC breakpoint for gentamicin
J. Antimicrob. Chemother. 2000; 46:851-852.
6. **Ballow C.H., Biedenbach D.J., Rossi F., Jones R.N.; LA-ZAPS Study Group.**
Multicenter assessment of the linezolid spectrum and activity using the disk diffusion and Etest methods: report of the Zyvox[®] antimicrobial potency study in Latin America (LA-ZAPS).
Braz. J. Infect. Dis. 2002; 6:100-109.
7. **Berrington A.W., Perry J.D., Gould F.K.**
Bactericidal activity of Moxifloxacin against *Staphylococcus aureus*.
Clin. Microb. Infect. Dis. 2001; 7:158-166.
8. **Blondeau J.M.**
A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new "respiratory quinolones".
J. Antimicrob. Chemother. 1999; 43 (Suppl. B): 1-11.
9. **Bostic G.D., Perri M.B., Thal L.A., Zervos M.J.**
Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrugresistant enterococci.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 30:109-112.
10. **Boswell F.J., Andrews J.M., Ashby J.P., Fogarty C., Brenwald N.P., Wise R.**
The *in-vitro* activity of HMR 3647, a new ketolide antimicrobial agent.
J. Antimicrob. Chemother. 1998; 42:703-709.

11. **Boswell F.J., Andrews J.M., Jevons G., Wise R.**
Comparison of the *in-vitro* activities of several new fluoroquinolones against respiratory pathogens and their abilities to select fluoroquinolone resistance.
J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50:495-502.
12. **Boswell F.J., Ashby J.P., Andrews J.M., Wise R.**
Effect of protein binding on the *in-vitro* activity and pharmacodynamics of faropenem.
J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50:525-532.
13. **Breiman R.F., Butler J.C., Tenover F.C., Elliot J.A., Facklam R.R.**
Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the US.
JAMA. 1994; 271:1831-1835.
14. **Broeck P.J.v.d.**
Activity of antibiotics against microorganisms ingested by mononuclear phagocytes.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991; 10:114-118
15. **Broeck P.J.v.d., Koot T.G.A., Strijen E.v., Mattie H.**
Intracellular activity of trovafloxacin against *Staphylococcus aureus*.
J. Antimicrob Chemother. 1999; 44:193-199
16. **Burkhardt F.**
Mikrobiologische Diagnostik
Lehrbuch, Thieme Verlag, Stuttgart 1992: 717.
17. **Carrier M.B., Scorneaux B., Zenebergh A., Desnottes J.F., Tulkens P.M.**
Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages.
J. Antimicrob. Chemother. 1990; 26 (Suppl. B):27-39.
18. **Carlone N.A., Cuffini A.M., Tullio V., Cavallo G.**
Interactions of antibiotics with phagocytes in vitro.
J. Chemother. 1991; Suppl.1:98-104.
19. **Carryn S., Van Bambeke F., Mingeot-Leclercq M.P., Tulkens P.M.**
Comparative intracellular activities of β -Lactams, Azithromycin, Gentamicin, and Fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations.
Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:2095-2103.
20. **Chomarar M.**
Résistance du pneumocoque aux antibiotiques: Résultats portant sur 19 observatoires pour l'année 1999.
Presse Med. 2001; 1:5-6.

21. **Christ H.**
Lymphatische Zellen aus Humanblut: Isolierung und Subzelluläre Fraktionierung.
Dissertation, Frankfurt am Main 1982
22. **Collignon P., Turnidge J.**
Fusidic acid in vitro activity.
Int. J. Antimicrob. Agents 1999; 12:45-58.
23. **Cuny C., Witte W.**
In vitro activity of linezolid against staphylococci.
Clin. Microb. and Inf. 2000; 6:331-333.
24. **Dalhoff A.**
Pharmacodynamics of fluoroquinolones.
J. Antimicrob. Chemother. 1999; 43 (Suppl. B):51-59.
25. **Dalhoff A., Petersen U., Endermann R.**
In vitro activity of Bay 12-8039, a new 8-methoxyquinolone.
Chemotherapy 1996; 6:410-425.
26. **Daly J.S., Eliopoulos G.M., Willey S., Moellering R.C.**
Mechanism of action and in vitro and in vivo activities of S-6123, a new oxazolidinone compound.
Antimicrob. Agents Chemother. 1988; 32:1341-1346.
27. **Davies T.A., Ednie L.M., Hoellman D.M., Pankuch G.A. et al.**
Antipneumococcal activity of ABT-773 compared to those of 10 other agents.
Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44:1894-1899.
28. **Decousser J.W., Allouch P.Y., Courvalin P., Leclercq R., et al.**
In vitro activity of moxifloxacin against recent community-acquired respiratory tract pathogens isolated in France: a national survey.
Int. J. Antimicrob. Agents 2002; 20:186-195.
29. **Diekema D.J., Jones R.N.**
Oxazolidinone antibiotics.
Lancet 2001; 358: 1975-1982.
30. **Doern G.V., Heilmann K.P., Huynh H.K., Rhomberg P.R. et al.**
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. 2001; 45:1721-1729.
31. **Easmon C.S.F., Crane J.P.**
Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils.
J. Antimicrob. Chemother. 1985; 16:67-73.

32. **Easmon C.S.F., Crane J.P.**
Effect of ciprofloxacin on intracellular organisms: in-vitro and in-vivo studies.
J. Antimicrob. Chemother. 1986; 18 (Suppl. D):43-48.
33. **Eiff C.v., Peters G.**
Comparative in-vitro activities of Moxifloxacin, Trovafloxacin, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid against Staphylococci.
J. Antimicrob. Chemother. 1999; 43:569-573.
34. **Eng R.H., Padberg F.T., Smith S.M., Tan E.N., Cherubin C.E.**
Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria.
Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35:1824-1828.
35. **Esposito S., Noviello S., Ianniello F.**
Bactericidal activity of moxifloxacin compared to grepafloxacin and clarithromycin against *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* investigated using an in vitro pharmacodynamic model.
J. Chemother. 2000; 12:475-481.
36. **Esposito S., Noviello S., Ianniello F.**
Activity of moxifloxacin and twelve other antimicrobial agents against 216 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.
Chemotherapy 2001; 47:90-96.
37. **Fass R.J.**
In-vitro activity of Bay 12-8039, a new 8-Methoxyquinolone.
Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:1818-1824.
38. **Garcia I., Pascual A., Guzman C.M., Perea E.J.**
Uptake and intracellular activity of sparfloxacin in human polymorphonuclear leukocytes and tissue culture cells.
Antimicrob. Agents Chemother. 1992; 36:1053-1056.
39. **Garcia I., Pascual A., Perea E.J.**
Intracellular penetration and activity of Bay Y 3118 in human polymorphonuclear leukocytes.
Antimicrob. Agents Chemother. 1994; 38:2426-2429.
40. **Gemmell C.G.**
Susceptibility of a variety of clinical isolates to linezolid: a European inter-country comparison.
J. Antimicrob. Chemother. 2001; 48:47-52.
41. **Gonzales R.D., Schrckenberger P.C., Graham M.B., Kelkar S. et al.**
Infections due to Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to Linezolid.
The Lancet 2001; 357:183-187.

42. **Gradelski E., Valera L., Kolek B., Bonner D., Fung-Tomc J.**
Comparative killing kinetics of the novel des-fluoro(6)quinolone BMS-284756, fluoroquinolones, vancomycin and β -lactams.
Int. J. Antimicrob. Agents 2001; 18:43-48.
43. **Hakenbeck R.**
Penicillin-resistente Streptococcus pneumoniae.
Chemotherapie J. 1998; 7:43-49.
44. **Hardy D., Amsterdam D., Mandell L.A., Rotstein C.**
Comparative in-vitro activities of Ciprofloxacin, Gemifloxacin, Grepafloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of gram-positive cocci.
Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44:802-805.
45. **Helm E.B.**
Antibakterielle Aktivität von Antibiotika in Körperflüssigkeiten.
Rheindruck-Boppard, 1977.
46. **Helm E.B., Paulus I., Shah P.M., Stille W.**
Antibakterielle Aktivität von Antibiotika in menschlicher Galle.
Infection 1976; 2:94-101.
47. **Herrera-Insua I., Jacques-Palaz K., Murray B.E., Rakita R.M.**
Intracellular activities of RP 59500 (quinupristin/dalfopristin) and sparfloxacin against Enterococcus faecium.
Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40:886-890.
48. **Herrero I.A., Issa N.C., Patel R.**
Nosocomial spread of Linezolid-resistant, Vancomycin-resistant Enterococcus faecium.
N. Engl. J. Med. 2002; 346:867-869.
49. **Hillmann S.**
Präparation von Leukozyten aus peripherem Blut bei hämatologischen Erkrankungen: Trennung im Percoll[®]-Dichtegradienten.
Dissertation, Frankfurt am Main 1984.
50. **Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y.**
Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin.
The Lancet 1997; 350:1670-1673.
51. **Hof H.**
Können Antibiotika auf intrazelluläre Bakterien wirken?
Chemotherapie J. 1998; 7:77-85.

52. **Höffler D.**
Antibiotikatherapie.
Dtsch. Ärzteblatt 1997; 18:1236-1238.
53. **Hsueh P.R., Liu Y.C., Yang D., Yan J.J., Wu T.L., Huang W.K., et al.**
Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of major bacterial pathogens in intensive care units in 2000 in Taiwan.
Microb. Drug Resist. 2001; 7:373-382.
54. **Huppertz K., Wiedemann B.**
GENARS-Projekt etabliert (Übersicht).
Chemotherapie J. 2000; 6:200-212.
55. **Johansen H.K., Jensen T.G., Dessau R.B., Lundgren B., Frimodt-Moller N.**
Antagonism between penicillin and erythromycin against *Streptococcus pneumoniae* *in vitro* and *in vivo*.
J. Antimicrob. Chemother. 2000; 46:973-980.
56. **Johnson A.P., Warner M., Hallas G., Livermore D.M.**
Susceptibility to quinopristin/dalfopristin and other antibiotics of vancomycin-resistant enterococci from the UK, 1997 to mid-1999.
J. Antimicrob. Chemother. 2000; 46:125-128.
57. **Jonas D., Engels I., Friedhoff C., Spitzmüller B., Daschner F.D., Frank U.**
Efficacy of moxifloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin and levofloxacin against intracellular *Legionella pneumophila*.
J. Antimicrob. Chemother. 2001; 47:147-152.
58. **Jones R.N., Johnson D.M., Erwin M.E.**
In-vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones.
Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40:720-726.
59. **Kampf G., Gastmeier P., Wischnewski N., Schlingmann J. et al.**
Analysis of risk factors for nosocomial infections – result from the first national prevalence survey in Germany (NIDEP study part I).
J. Hosp. Infect. 1997; 37:103-112.
60. **Kayser F.H., Santanam P., Huf E.**
Vergleichende Aktivität von Moxifloxacin und weiteren Chinolonen gegen Staphylokokken.
Chemother J. 2000, 3:114-119.
61. **Kim J.H., Kang J.A., Kim J.W., Lee J.H., Choi E.C., Kim B.K.**
In vitro and in vivo antibacterial efficacies of CFC-222, a new fluoroquinolone.
Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41: 2209-2213.

62. **King A., May J., Phillips I.**
Comparative activity of Quinupristin/Dalfopristin and RPR 106972 and the effect of medium on in-vitro test results.
J. Antimicrob. Chemother. 1998; 42:711-719.
63. **Klein P.**
Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis.
Lehrbuch, Springer-Verlag 1957:9-13.
64. **Klugman K.P., Capper T.**
Concentration-dependent killing of antibiotic-resistant pneumococci by the methoxyquinolone Moxifloxacin.
J. Antimicrob. Chemother. 1997; 40:797-802.
65. **Klugman K.P., Koornhof H.J.**
Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979 – 1986.
J. Infect. Dis. 1988; 158:956-964.
66. **Koga H., Itoh A., Murayama S., Suzue S., Irikura T.**
Structure-activity relationships of antibacterial 6, 7- and 7, 8-disubstituted 1-alkyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinolone-3-carboxylic acids.
J. Medicinal. Chemistry 1980; 23:1358-1363.
67. **Kolbert M., Shah P.M.**
Häufigkeit multiresistenter Enterokokken in Stuhlproben bei Patienten auf internistischen Stationen eines Universitätsklinikums.
Chemotherapie J. 2000; 6:213-217.
68. **Korn S., Raufi S.M., Rosenthal E.J.K., Shah P.M.**
Susceptibility of recent Streptococcus pneumoniae strains isolated in the Frankfurt/Main region from patients in the community.
ICC Birmingham 1999.
69. **Kresken M., Hafner D.**
Prävalenz der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa.
Chemother J. 1996; 5:225-230.
70. **Kresken M., Hafner D. and the Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy.**
Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in Central Europe during 1975-1995.
Infection 1999; 27(Suppl 2): S2-S8.
71. **Kresken M., Hafner D., Witte W., Reinert R.**
Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen grampositiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum.
Chemother J. 2000; 19:5-14.

72. **Kresken M., Hafner D. und die Studiengruppe bakterielle Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie.**
Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa.
Chemotherapie J. 2000; 2:51-86.
73. **Krueger W.A., Unertl K.E.**
Epidemiologie grampositiver Infektionen auf Intensivstationen.
Chemother J. 2000;19:2-4.
74. **Lacey R.W., Barr K.W.**
Protein-binding of anti-staphylococcal antibiotics.
J. Antimicrob. Chemother. 1986; 17:679-686.
75. **Lamp K.C., Rybak M.J., Bailey E.M., Kaatz G.W.**
In vitro pharmacodynamic effects on concentration, pH, and growth phase on serum bactericidal activities of daptomycin and vancomycin.
Antimicrob. Agents Chemother. 1992; 36:2709-2714.
76. **Lee H.J., Park J.Y., Jang S.H., Kim J.H. et al.**
High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea.
Clin. Infect. Dis. 1995; 20:826-835.
77. **Lescher G.Y., Forelich E.D., Gruet M.D., Bailey H.J., Brundage R.P.**
1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents.
J. Med. Pharma. Chem. 1962, 5:1063-1068.
78. **Linãres J., Pallares R., Alonso T., Perez J.L. et al.**
Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990).
Clin. Infect. Dis. 1992; 15:99-105.
79. **Malathum K., Singh K.V., Murray B.E.**
In-vitro activity of Moxifloxacin, a new 8-Methoxyquinolone, against gram-positive bacteria.
Dign. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 35:127-33.
80. **Mandell G.L., Coleman J.**
Activities of antimicrobial agents against intracellular Pneumococci.
Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 2561-2563.
81. **Marton A., Gulyas M., Muñóz R., Tomasz A.**
Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary.
J. Infect. Dis. 1991; 163:542-548.

- 82. Moretti M.V., Fiorio M., Pasticci M.B., Moretti A., Baldelli F., Pauluzzi S.**
Killing rate and serum bactericidal activity of oxacillin, rifampicin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*.
Microbiologica. 1989; 12:297-306.
- 83. Maurin M., Raoult D.**
Use of aminoglycosides in treatment of infectious due to intracellular bacteria.
Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 2977-2986.
- 84. Naber K.G.**
Antibacterial activity of antibacterial agents in urine: an overview of applied methods.
Bergan T (ed): *Urinary tract infections*. Infectiology. Basel, Karger 1997; 1:74-83.
- 85. Nagl M., Neher C., Hager J., Pfaulser B., Schmutzhard E., Allerberger F.**
Bactericidal activity of Vancomycin in cerebrospinal fluid.
Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:1932-1934.
- 86. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards.**
Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – fifth edition.
NCCLS document M07-A5 [ISBN 1-56238-394-9].
NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.
- 87. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards.**
Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline.
NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1].
NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1999.
- 88. Nielsen S.L., Obel N., Storgaard M., Andersen P.L.**
The effect of quinolones on the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in neutrophil granulocytes.
J. Antimicrob. Chemother. 1997; 39: 617-622.
- 89. Paillard D., Grellet J., Dubois V., Saux M.C., Quentin C.**
Discrepancy between uptake and intracellular activity of moxifloxacin in a *Staphylococcus aureus*-Human THP-1 monocytic cell model.
Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:288-293.
- 90. Pascual A., Garcia I., Ballesta S., Perea E.J.**
Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells.
Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:12-15.

91. **Pascual A., Garcia I., Ballesta S., Perea E.J.**
Uptake and intracellular activity of trovafloxacin in human phagocytes and tissue-cultured epithelial cells.
Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:274-277.
92. **Patel R., Rouse M.S., Piper K.E., Steckelberg J.M.**
In-vitro activity of Linezolid against Vancomycin-resistant enterococci, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*.
Dign. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 34:119-22.
93. **Pertoft H., Lindhal-Kiessling K.**
Separation of various blood cells in colloidal Silica-Polyvinylpyrrolidone gradients.
Exp. Cell. Res. 1968; 50:355-368.
94. **Pertoft H., Rubin K., Kjellen L., Laurent T.C.**
The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium Percoll™.
Exp. Cell. Res. 1977; 110:449-457.
95. **Reacher M.H., Shah A., Livermore D.M., Wale M.C.J. et al.**
Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: Trend analysis.
Brit. Med. J. 2000; 320:213-216.
96. **Reinert R.R., Schlaeger J.J., Lütticken R.**
Moxifloxacin: a comparison with other antimicrobial agents of in-vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*.
J. Antimicrob. Chemother. 1998; 42:803-806.
97. **Reinert R.R., Conrads G., Schlaeger J.J., Werner G., Witte W. et al.**
Survey of antibiotic resistance among Enterococci in North Rhine-Westphalia.
J. Clin. Microbiol. 1999; 37:1638-1641.
98. **Reinert R.R., Simic S., Al-Lahham A., Reinert S., Lemperle M., Lütticken R.**
Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients with respiratory tract infections in Germany from 1998 to 1999: Results of a national surveillance study.
J. Clin. Microbiol. 2001; 39:1187-1189.
99. **Reinert R.R., Eiff C.v., Kresken M., Brauers J., Hafner D. et al.**
Nationwide German multicenter study on the prevalence of antibiotic resistance in streptococcal blood isolates from neutropenic patients and comparative in vitro activities of quinupristin/dalfopristin and eighth other antimicrobials.
J. Clin. Microbiol. 2001; 39:1928-1931.

- 100. Rosenthal E.J.K.**
Epidemiologie von Septikämie-Erregern.
Dtsch. Med. Wochenschr 1993; 118:1269-1275.
- 101. Rous P., Jones F.S.**
The protection of pathogenic microorganisms by living tissue cells.
J. Exp. Med. 1916; 23:601.
- 102. Rubinstein E., Diamantstein L., Yoseph G., Gruzman G., Rubinovitch B., Barzilai A., Keller N.**
The effect of albumin globulin, pus and dead bacteria in aerobic and anaerobic conditions on the antibacterial activity of moxifloxacin, trovafloxacin and ciprofloxacin against *S. pneumoniae*, *S. aureus* and *E. coli*.
Clin. Microbiol. Infec. 2000, 12:678-681.
- 103. Rybac M.J., Capellety D.M., Moldovan T., Aeschlimann J.R., Kaatz G.W.**
Comparative in vitro activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperzolid (PNU 100592) and linezolid (PNU 10777) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococci, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.
Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42:721-724.
- 104. Schwab J.C., Mandell G.L.**
The importance of penetration of antimicrobial agents into cells.
Infect. Dis. Clin. N. Am. 1989; 3:461-467.
- 105. Seral C., Bambeke F.v., Tulkens P.M.**
Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in Mouse J774 Macrophages.
Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47:2283-2292.
- 106. Shah P.M.**
Untersuchungen über die Kinetik der Bakterizidie bei Enterobakterien.
Dissertation, Frankfurt/Main 1971.
- 107. Shah P.M.**
Bactericidal activity of ciprofloxacin in human blood.
Chemotherapia 1984:383-384.
- 108. Shah P.M., Jaenisch E.**
Aktivität der Cephalosporine der dritten Generation im menschlichen Blut.
Clinical Therapeutics 1983; 6:1-6
- 109. Shah P.M., Kühn G., Stille W.**
Aktivität subinhibitorischer Konzentrationen von Mezlocillin in menschlichem Blut.
Zschr. Antimikrob. Antineopl. Chemoth. 1983; 1:61-65

- 110. Simon C., Stille W.**
Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis.
Schattauer Verlag, Stuttgart, 2000.
- 111. Slee A.M., Wuonola M.A., McRipley R.J. et al.**
Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721.
Antimicrob. Agents Chemother. 1987; 31:1971-1997.
- 112. Stock I., Machka K., Wiedemann B.**
Resistenzsituation aerober und fakultativ anaerober klinischer Bakterienisolate.
Chemotherapie J. 2001; 1:1-19.
- 113. Thomas C.A.**
Isolierung und Bestimmung der Phagozytose und Bakterizidie neutrophiler segmentkerniger Granulozyten.
Dissertation, Frankfurt/Main, 1986.
- 114. Tsiodras S., Gold H.S., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Wennersten C. et al.**
Linezolid resistance in a clinical isolate of *Streptococcus aureus*.
The Lancet 2001; 358:207-208.
- 115. Tulkens P.M.**
Accumulation and subcellular distribution of antibiotics in macrophages in relation to activity against intracellular bacteria.
W. Zuckschwerdt Verl. 1990: Ciprofloxacin in Pulmonology: 12-20.
- 116. Tulkens P.M.**
Intracellular Distribution and activity of antibiotics.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991, 10:100-106.
- 117. Uttley A.H.C., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.**
Vancomycin-resistant Enterococci.
The Lancet 1988; 3:57-58.
- 118. Wise R., Andrews J.M., Boswell F.J., Ashby J.P.**
The in-vitro activity of linezolid (U-100766) and tentative breakpoints.
J. Antimicrob. Chemother. 1998; 42:721-728.
- 119. Woodcock J.M., Andrews J.M., Boswell F.J., Brenwald N.P., Wise R.**
In-vitro activity of Bay 12-8039, a new fluoroquinolone.
Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:101-106.
- 120. Zurenko G.E., Gibson J.K., Shinabarger D.L., Aristoff P., Ford C. et al.**
Oxazolidinones: a new class of antibiotics.
Curr. Opin. Pharmacol. 2001; 1:470-476.

- 121. Zurenko G.E., Todd W.M., Hafkin B.A.**
Development of Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated with Linezolid.
ICCAC, San Francisco, CA, USA, 1999.
- 122. Zurenko G.E., Yagi B.H., Schaadt R.D., Allison J.W. et al.**
In-vitro activities of U-100592 and U-100766, novel Oxazolidinone antibacterial agents.
Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40:839-845.

10. ANHANG

Nährmedien

Isosensitest-Bouillon (OXOID, Best-Nr.: CM473)

Mueller Hinton Agar (OXOID, Best-Nr.: CM337)

Columbia Blut Agar (Becton Dickinson, Best-Nr.: 254071)

Medium 199 Earle 1x (Biochrom KG, Best-Nr.: F 0615)

Salzlösungen

DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Bio Whittaker, Best-Nr.: BE17-512F)

Hanks Salt Solution 10x (Biochrom KG, Best-Nr.: L 2025)

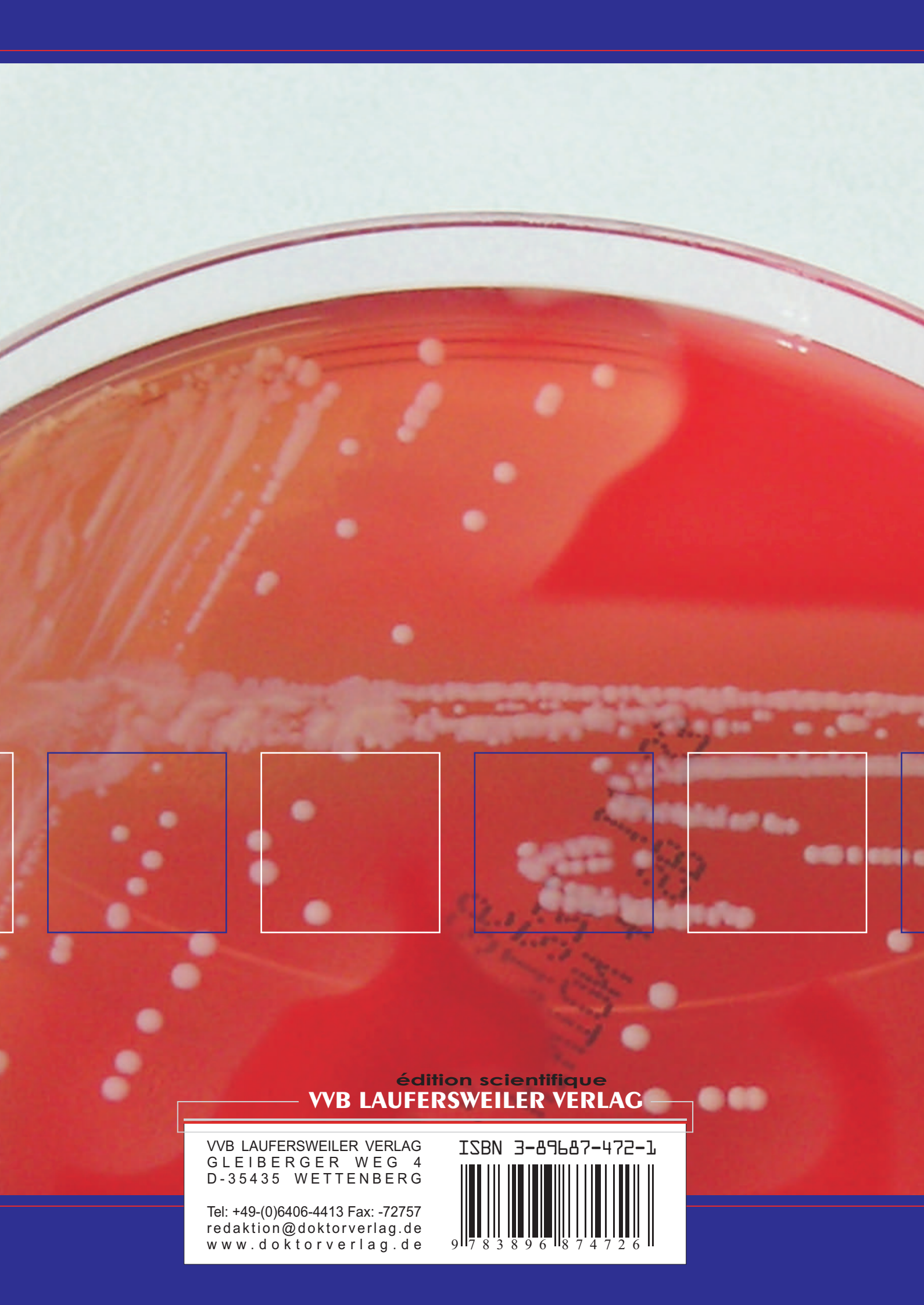
Percoll™ (Amersham Pharmacia Biotech AB, Best-Nr.: 17-0891-01)

0,9 % NaCl-Lösung (Braun Melsungen, Nr.: 6724092.00.00)

Sonstige Materielien

Aqua destillata (Braun Melsungen, Nr.: 6726174.00.00)

Türks Lösung: Essigsäure-Gentianaviolettlösung (Best-Nr.: 9277)



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-472-1



9 783896 874726