

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor
Dr. med. Jonathan Jantsch

**Antimikrobielle Empfindlichkeit von *Aerococcus urinae*
und *Aerococcus sanguincola* und
Etablierung eines in vitro Testverfahrens für
5-Nitro-8-hydroxychinolin (Nitroxolin)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Aysel Ahmadzada
aus Baku, Aserbaidshan

promoviert am 17. Juni 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. F. M. Fuchs

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Jantsch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die der vorliegenden Dissertationsarbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. Hamprecht, PD Dr. F. Fuchs und der AG Hamprecht durchgeführt.

Die in dieser Dissertation dargestellten experimentellen Arbeiten wurden nach fachlicher Anleitung und unter kontinuierlicher wissenschaftlicher Supervision durch Herrn PD Dr. F. Fuchs von mir selbst durchgeführt. Die klinischen Isolate stammten aus der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln. Ich war selbst für die Subkultivierung und Archivierung der Isolate verantwortlich.

Die Durchführung der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfungen von Nitroxolin erfolgte vollständig durch mich. Die Vorbereitung des Testmediums für die Agardilutionsmethode erfolgte durch Marco Schwabe (Leitung von Culture Media Development am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde von mir durchgeführt und inhaltlich mit Herrn PD Dr. F. Fuchs diskutiert. Die grafische Darstellung der Ergebnisse sowie der Entwurf des Manuskripts dieser Dissertationsschrift stammen, sofern nicht anders angegeben, aus meiner eigenen Arbeit.

Die Einreichung der zugrunde liegenden Publikation erfolgte durch Prof. Dr. A. Hamprecht, die des ePosters durch Herrn PD Dr. F. Fuchs.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 31.03.2026

Unterschrift:

Danksagung

Herrn PD Dr. Fuchs danke ich für die Überlassung des Themas, hervorragende Betreuung bei allen Phasen der Arbeit, fachliche Begleitung sowie sein Vertrauen während des gesamten Promotionsprozesses.

Herrn Prof. Dr. Hamprecht danke ich besonders für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie. An erster Stelle danke ich meinem geliebten Mann für seine stetige Unterstützung, seine Geduld und seinen Rückhalt in allen Phasen dieser Arbeit.

Ebenso meinen Eltern, meinem Bruder und Freunde, die mich mit ihren Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation liebevoll unterstützt haben.

Widmung

Diese Arbeit widme ich meiner geliebten Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	11
2.1. Harnwegsinfektionen	11
2.1.1. Epidemiologie	11
2.1.2. Ätiologie und Pathogenese	12
2.1.3. Erregerspektrum	13
2.2. Die Gattung <i>Aerococcus</i>	15
2.3. Testmethoden	17
2.4. Getestete Antibiotika	22
2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	24
3. PUBLIKATION	25
4. DISKUSSION	32
4.1. Ergebnisse	32
4.2. Aerokokken-Breakpoints	35
4.3. Limitationen	36
4.4. Ausblick	37
4.5. Schlussfolgerung	38
5. LITERATURVERZEICHNIS	39
6. ANHANG	46
6.1. Abbildungsverzeichnis	46
6.2. Tabellenverzeichnis	46
7. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	47

Abkürzungsverzeichnis

β-NAD	β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAU	European Association of Urology
ESBL	Extended-Spectrum-β-Lactamase
EUCAST	Europäisches Komitee für Antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen
HWI	Harnwegsinfektion
I	Sensibel bei erhöhter Dosis/Exposition
IMMIH	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln
KBE	Koloniebildende Einheit
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser- Desorption / Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie
MH-F-Agar	Müller-Hinton-Fastidious-Agar
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MHK	Minimale Hemmkonzentration
QC	Quality Control
R	Resistent
S	Sensibel
spp	Spezies
WGS	Whole Genome Sequencing

1. Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören weltweit zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten in der ambulanten und stationären Versorgung. Sie betreffen alle Altersgruppen, treten jedoch besonders häufig bei Frauen, älteren Menschen, sowie bei Personen mit urologischen Grunderkrankungen auf.¹ Während *Escherichia coli* weiterhin der dominierende Erreger der HWI ist, werden zunehmend auch weniger bekannte Erreger wie *Aerococcus urinae* und *Aerococcus sanguinicola* als relevante uropathogene Keime erkannt.^{2,3} Diese Erreger wurden lange Zeit vermutlich unterschätzt, da sie aufgrund limitierter diagnostischer Möglichkeiten häufig als andere Gram-positive Kokken fehlidentifiziert oder als klinisch nicht relevant interpretiert wurden.⁴ Erst der zunehmende Einsatz von MALDI-TOF-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie) ermöglichte eine zuverlässige Identifizierung von *Aerococcus* spp. Dies führte zu einem besseren Verständnis ihrer Rolle als uropathogene Erreger.

A. urinae und *A. sanguinicola* können nicht nur unkomplizierte Harnwegsinfektionen verursachen, sondern auch schwere Infektionen wie Endokarditis oder Bakteriämie, insbesondere bei höherem Lebensalter, Immunsuppression oder urologischen Grunderkrankungen.^{2,4} Trotz dieser Relevanz liegen bislang nur begrenzte Daten zur Antibiotikaempfindlichkeit vor. Insbesondere für oral verfügbare Wirkstoffe wie Nitroxolin, das in Deutschland zur Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfektionen zugelassen ist, fehlen Daten zur *in vitro* Aktivität gegen *Aerococcus* spp. Zudem existiert für diese Fragestellung kein standardisiertes Testverfahren.^{1,5} Das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) hat bisher nur für wenige ausgewählte Antibiotika Grenzwerte für Aerokokken festgelegt. Diese umfassen zudem zahlreiche Substanzen, die in der Behandlung von Harnwegsinfektionen in der Regel nicht eingesetzt werden (z. B. Vancomycin, Rifampicin) oder deren Anwendung aus Gründen der Verträglichkeit oder im Sinne eines rationalen Antibiotikaeinsatzes grundsätzlich zurückhaltend erfolgen sollte (z. B. Meropenem, Ciprofloxacin). Nitroxolin erreicht nach oraler Gabe hohe Konzentrationen in den ableitenden Harnwegen.⁶ Wegen der insgesamt limitierten oralen Therapieoptionen erscheint es daher sinnvoll, die grundsätzliche Empfindlichkeit von *A. urinae* und *A. sanguinicola* gegenüber diesem Antibiotikum zu untersuchen.

Für die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber etablierten Antibiotika stehen standardisierte Verfahren nach EUCAST zur Verfügung. Für Nitroxolin hingegen existierte bislang kein validiertes Testverfahren zur Bestimmung der Empfindlichkeit von *Aerococcus* spp.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Nitroxolin bei klinischen Isolaten von *A. urinae* und *A. sanguinicola*. Dieses Verfahren wurde gemäß den EUCAST-Vorgaben für

anspruchsvolle Erreger adaptiert und systematisch eingesetzt. Zuvor lagen weder Studien zur Empfindlichkeitstestung noch zur *in vitro* Wirksamkeit von Nitroxolin gegenüber *Aerococcus* spp. vor.

Zwischen Dezember 2016 und Juni 2018 wurden insgesamt 184 Isolate aus im mikrobiologischen Labor des Universitätsklinikums Köln untersuchten Urinproben analysiert, darunter 166 *A. urinae*- und 18 *A. sanguinicola*-Isolate. Die Empfindlichkeit gegenüber Benzylpenicillin, Ampicillin, Meropenem, Ciprofloxacin, Rifampicin, Vancomycin und Nitrofurantoin wurde gemäß den EUCAST-Empfehlungen mittels Agardiffusionstestung bestimmt und anhand der vorliegenden Grenzwerte interpretiert. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Nitroxolin wurde für jedes Isolat mittels Agardilution die minimale Hemmkonzentration ermittelt. Zusätzlich wurde die Aktivität von Nitroxolin mit einem zweiten Testverfahren, der Agardiffusion, untersucht und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen.

Im Ergebnis zeigten beide Spezies eine vollständige Empfindlichkeit gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika, Vancomycin und Rifampicin. Nur bei Ciprofloxacin lagen regelhaft Resistenzen vor (10,9 % aller Isolate). Die MHK von Nitroxolin bei *A. urinae* waren niedrig (MHK_{50/90} 1/2 mg/L), während sie bei *A. sanguinicola* deutlich höher lagen (MHK_{50/90} 64/128 mg/L). Unter Berücksichtigung des EUCAST-Grenzwertes für Nitroxolin bei *E. coli* und unkomplizierten Harnwegsinfektionen (≤ 16 mg/L) erscheint eine klinische Wirksamkeit bei *A. urinae* aufgrund der niedrigen MHK-Werte und der nach oraler Gabe erreichbaren hohen Urinkonzentrationen sehr wahrscheinlich, während die deutlich höheren MHK-Werte bei *A. sanguinicola* eine eingeschränkte Wirksamkeit vermuten lassen.⁷ Bei Anwendung dieses Grenzwertes für *E. coli* und unkomplizierte Harnwegsinfektionen (≤ 16 mg/L) wären 97,6 % der *A. urinae*-Isolate als sensibel zu einstufen, alle *A. sanguinicola*-Isolate hingegen als resistent.

Da sowohl die Hypothese einer Effektivität gegen *A. urinae* als auch die Idee einer Ineffektivität gegenüber *A. sanguinicola* lediglich auf der Interpretation von MHK-Werten basieren, müssen sie in Folgestudien unter Messung klinischer Endpunkte bestätigt werden.

Es besteht ein dringender Bedarf an alternativen, wirksamen oralen Therapieoptionen für unkomplizierte Harnwegsinfektionen. In einem Rote-Hand-Brief aus dem Jahr 2019 wurde auf das Risiko schwerwiegender, langanhaltender und potenziell irreversibler Nebenwirkungen unter Verabreichung von Fluorchinolonen hingewiesen.⁸ Betroffen sind insbesondere der Bewegungsapparat (z. B. Tendinitis und Sehnenrupturen) sowie das zentrale und periphere Nervensystem (z. B. Neuropathien, Schlafstörungen und Depressionen). Daher sollten Fluorchinolone bei leichten oder selbstlimitierenden Infektionen, insbesondere bei unkomplizierter Zystitis, nicht mehr eingesetzt werden, sofern geeignete Alternativen zur Verfügung stehen. Die aktuelle deutsche S3-Leitlinie für ambulant erworbene Harnwegsinfektionen bei Erwachsenen (2024) empfiehlt für die empirische Therapie der

akuten unkomplizierten Zystitis insbesondere Nitrofurantoin, Fosfomycin-Trometamol, Pivmecillinam und Nitroxolin. Für Aerokokken liegen bislang jedoch ausschließlich für Nitrofurantoin etablierte Grenzwerte vor.

Das in dieser Arbeit entwickelte Agardilutionsverfahren zur MHK-Bestimmung liefert eine methodische Grundlage für die differenzierte Bewertung von Nitroxolin bei *A. urinae* und *A. sanguincola*. Die nachgewiesene Korrelation mit der Agardiffusion ermöglicht gleichzeitig die Anwendung eines weniger aufwändigen Testverfahrens.

Zusammenfassend liefert diese Studie neue relevante Daten zur antimikrobiellen Empfindlichkeit von Aerokokken aus Harnwegsinfektionen, mit erstmaliger Beschreibung der *in vitro* Wirksamkeit von Nitroxolin. Da Nitroxolin bereits zur oralen Therapie von Harnwegsinfektionen zugelassen ist, können die gewonnenen Ergebnisse und die hier etablierten Verfahren in Folgestudien eingesetzt werden, insbesondere zur Überprüfung der klinischen Wirksamkeit bei Harnwegsinfektionen mit *A. urinae*.

2. Einleitung

2.1. Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen (HWI) umfassen Infektionen verschiedener Abschnitte des Harntrakts. Sie werden durch das Vorliegen typischer klinischer Symptome in Kombination mit dem mikrobiologischen Nachweis von Erregern im Urin definiert. Zu den Leitsymptomen einer lokalisierten Harnwegsinfektion zählen Dysurie, Pollakisurie, imperativer Harndrang sowie suprapubische Schmerzen. Bei systemischer Beteiligung können zusätzlich Fieber, Schüttelfrost, Flankenschmerzen und ein reduzierter Allgemeinzustand auftreten.⁹

2.1.1. Epidemiologie

Harnwegsinfektionen gehören weltweit zu den häufigsten bakteriellen Infektionen im ambulanten und stationären Bereich. Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 150 Millionen Harnwegsinfektionen auftreten.¹⁰ Sie verursachen dabei erhebliche medizinische und ökonomische Belastungen, sowohl im Hinblick auf die Krankheitslast als auch auf den Antibiotikaverbrauch. In Europa entfallen etwa 10 bis 20 % aller Antibiotikaverschreibungen im ambulanten Bereich auf die Behandlung von HWI.^{1,11} Auch in deutschen Hausarztpraxen gehören sie zu den häufigsten Gründen für eine ärztliche Vorstellung und antibiotische Therapie.¹

Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer.^{12,13} Zusätzliche Risikofaktoren sind sexuelle Aktivität, hormonelle Umstellungen (z.B. Schwangerschaft, Postmenopause) und eine genetische Prädisposition.^{11,14}

Bei Männern ist die Inzidenz von Harnwegsinfektionen insgesamt deutlich geringer, nimmt jedoch mit steigendem Alter zu. Ursächlich hierfür sind häufig urologische Grunderkrankungen wie die benigne Prostatahyperplasie, Restharnbildung, Harnabflussstörungen sowie ein vermehrter Einsatz von transurethralen und suprapubischen Harnblasenkathetern. Auch operative Eingriffe und strukturelle Veränderungen im Urogenitaltrakt können das Risiko erhöhen.¹⁵

Besondere Aufmerksamkeit verdient die zunehmende Problematik der Antibiotikaresistenzen bei uropathogenen Erregern. Multiresistente Gram-negative Erreger, insbesondere solche mit der Fähigkeit zur Bildung von Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL) wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, gewinnen weltweit an Bedeutung und erschweren die empirische Therapie auch im ambulanten Bereich.¹⁶

Neben den klassischen uropathogenen Erregern werden zunehmend auch Gram-positive Kokken wie *Aerococcus* spp. als potenzielle Erreger von Harnwegsinfektionen beschrieben. Betroffen sind überwiegend ältere Personen, häufig mit zugrunde liegenden urologischen Erkrankungen, strukturellen Anomalien des Harntrakts oder liegenden Harnwegskathetern. In

einer multizentrischen Kohorte von Patientinnen und Patienten mit *Aerococcus*-Nachweis in Blutkulturen zeigte sich, dass bei der Mehrzahl der Bakteriämien ein urogenitaler Fokus vorlag, häufig auf dem Boden urologischer Risikofaktoren wie Prostataerkrankungen oder Harnsteinen.¹⁷ Endokarditiden wurden seltener beobachtet und traten lediglich im Zusammenhang mit *A. urinae* auf, jeweils im Rahmen monomikrobieller Bakteriämien.¹⁷ Auch eine japanische Fallserie bestätigte die Harnwege als häufigen Ausgangspunkt aerokokkenbedingter Bakteriämien: In 68 % der Fälle lag eine Harnwegsinfektion vor, wobei derselbe Erreger sowohl im Urin als auch in den Blutkulturen nachgewiesen wurde.¹⁸

Diese Daten unterstreichen die klinische Bedeutung von *Aerococcus* spp. als uropathogene Erreger und legen nahe, dass eine verbesserte Diagnostik und Therapie von Harnwegsinfektionen zur Vermeidung schwerwiegenderer Infektionen beitragen könnte.

2.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Harnwegsinfektionen werden gemäß der aktuellen S3-Leitlinie für ambulant erworbene Harnwegsinfektionen bei Erwachsenen (2024) in unkomplizierte und komplizierte Formen eingeteilt.¹ Unkomplizierte Harnwegsinfektionen betreffen überwiegend gesunde, nichtschwangere Frauen ohne funktionelle oder anatomische Anomalien des Harntrakts, wobei inzwischen auch jüngere Männer ohne zusätzliche Risikofaktoren dieser Gruppe zugeordnet werden. Komplizierte Harnwegsinfektionen liegen hingegen vor, wenn prädisponierende Faktoren wie Harnabflussstörungen, das Vorliegen von Fremdmaterial im Harntrakt (z. B. Katheter, Harnleiterschienen, Nephrostoma) oder relevante Grunderkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Immunsuppression) bestehen.

Klinisch wird zudem zwischen unteren Harnwegsinfektionen, wie der Zystitis, und oberen Harnwegsinfektionen, wie der Pyelonephritis, unterschieden. Letztere gehen mit einer Beteiligung des Nierenparenchyms einher und weisen potenziell schwerere Verläufe auf.¹⁶

Unkomplizierte Harnwegsinfektionen entstehen überwiegend durch eine ascendierende Kolonisation des Harntrakts mit uropathogenen Keimen aus der Darmflora.¹⁹ Die Pathogenese von Harnwegsinfektionen ist eng mit spezifischen Eigenschaften dieser Mikroorganismen verbunden, die es ihnen ermöglichen, den normalerweise sterilen Harntrakt zu kolonisieren und zu infizieren. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Gram-negative Stäbchenbakterien, insbesondere um *E. coli*.¹⁹

Uropathogene Bakterien besitzen spezifische Virulenzfaktoren, die ihnen eine Besiedlung und Infektion des Urothels ermöglichen. Dazu zählen Adhäsine wie P-Fimbrien und Typ-1-Fimbrien, die eine Anheftung an uroepitheliale Zellen vermitteln und den Erregern erlauben, der mechanischen Spülwirkung des Harnflusses zu entgehen.^{20,21} Zu den weiteren bedeutenden Mechanismen gehören die Bildung von Biofilmen, die Sekretion von Toxinen sowie die Eisenaufnahmesysteme, die das Überleben in der Harnumgebung unterstützen.²²

Darüber hinaus können bestimmte Stämme intrazellulär im Blasenepithel persistieren, was das Risiko chronischer Verläufe erhöht und die Entstehung rezidivierender Infektionen begünstigt.²³

Die Übertragung von uropathogenen Bakterien wird durch anatomische Verhältnisse wie die kurze Harnröhre bei Frauen und die Nähe des Anus zur Harnröhre begünstigt.^{12,13} Demgegenüber bietet die längere Harnröhre des Mannes in Kombination mit antibakteriellen Bestandteilen des Prostatasekrets einen gewissen Schutz vor Infektionen, was die insgesamt geringere Inzidenz von Harnwegsinfektionen bei Männern erklärt. Treten dennoch Infektionen auf, liegen häufig zusätzliche pathophysiologische Faktoren wie Restharnbildung oder Prostataerkrankungen zugrunde, die den Verlauf verkomplizieren können.²⁴

Patienten mit bestimmten Risikofaktoren, wie höheres Lebensalter, Immunsuppression oder Multimorbidität, sind anfälliger für Infektionen mit fakultativ pathogenen Erregern, darunter *Candida* spp. oder *Pseudomonas aeruginosa*.^{25,26} Auch Menschen mit einliegenden Dauerblasenkathetern gehören zu dieser Risikogruppe, da die Katheterisierung zur Entstehung komplizierter Harnwegsinfektionen beitragen kann und durch die längere Verweildauer das Infektionsrisiko steigt.²⁷

Als *signifikante Bakteriurie* bezeichnet man eine Keimzahl von $\geq 10^5$ koloniebildende Einheiten (KBE) pro Milliliter Mittelstrahlurin.⁹ Eine Sonderform stellt die asymptomatische Bakteriurie dar, bei der eine hohe Keimzahl typischer Uropathogene im Urin nachweisbar ist, ohne dass klinische Symptome bestehen. In Abwesenheit klinischer Symptome ist eine Therapie hier nur in definierten Situationen empfohlen, etwa bei Schwangeren oder vor invasiven urologischen Eingriffen.¹

2.1.3. Erregerspektrum

Das Erregerspektrum bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen wird überwiegend durch *E. coli* bestimmt. Mit großem Abstand folgen weitere Erreger, wie *Klebsiella pneumoniae* oder *Proteus mirabilis*, die jeweils nur einen geringen Anteil der Infektionen verursachen. Auch Streptokokken der Gruppe B sowie *Staphylococcus saprophyticus* werden als mögliche Erreger beschrieben. Andere Enterobacterales wie *Enterobacter* spp. oder *Citrobacter* spp. sind bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen deutlich seltener. Enterokokken werden vor allem bei Mischinfektionen nachgewiesen und ihre Pathogenität bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen ist weiterhin umstritten.¹

Die ARESC-Studie, die Patient*innen aus neun europäischen Ländern und Brasilien einbezog, wies *E. coli* bei 76,7 % der Patientinnen und Patienten mit unkomplizierter Zystitis nach, gefolgt von *P. mirabilis*, *S. saprophyticus* und *K. pneumoniae*.¹

In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass auch weniger bekannte Gram-positive Kokken wie *A. urinae* und *A. sanguincola* als potenziell uropathogene Erreger in Erscheinung

treten können. Die Nachweisraten von *A. urinae* variieren stark in Abhängigkeit vom Patientenkollektiv, den angewandten Diagnostikmethoden sowie den zugrunde liegenden Risikofaktoren. In klassischen Routinelaboren, die auf Standard-Urinkulturen setzen, wird der Erreger bei unter 1 % der Harnwegsinfektionen isoliert.²⁸ Demgegenüber berichten Studien, aus den USA, die molekularbiologische Nachweismethoden eingesetzt haben, über deutlich höhere Nachweisraten. So konnte *A. urinae* bei Personen höheren Lebensalters (≥ 60 Jahre) in bis zu 40,9 % der Mittelstrahlurinproben und in 20,3 % der Katheterurinproben von Frauen nachgewiesen werden; bei Männern lagen die Nachweisraten bei 19,5 % bzw. 7,9 %.²⁹ Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass *A. urinae* bei älteren und vulnerablen Patientengruppen eine bislang unterschätzte Rolle als Uropathogen spielt.

Ein wesentlicher Grund hierfür liegt in der erschwerten Identifikation mittels konventioneller mikrobiologischer Verfahren, da Aerokokken aufgrund ihrer phänotypischen Eigenschaften häufig als Teil der normalen Schleimhautflora fehlinterpretiert und als klinisch nicht relevant eingestuft wurden.³ Der zunehmende Einsatz der MALDI-TOF MS in der Routinediagnostik ermöglicht heute eine zuverlässige Identifikation und Abgrenzung von *A. urinae* gegenüber anderen alpha-hämolysierenden Kokken.³⁰ Dadurch konnten die Nachweisraten in den letzten Jahren deutlich gesteigert und mit klinischen Endpunkten korreliert werden. Dies spricht dafür, dass *A. urinae* häufiger an Harnwegsinfektionen beteiligt ist, als frühere Studien ohne MALDI-TOF-Identifikation vermuten ließen.⁴

Auch aktuelle europäische Leitlinien berücksichtigen *A. urinae* und *A. sanguinicola* mittlerweile explizit als uropathogene Erreger im Rahmen der Urindiagnostik.⁹

A. urinae wird in Urinkulturen häufig zusammen mit anderen uropathogenen Erregern nachgewiesen. In populationsbasierten Studien traten etwa ein Viertel der Isolate in Mischkulturen auf, meist in Kombination mit *E. coli*, *Klebsiella spp.* oder *Staphylococcus aureus*.^{2,31} *A. sanguinicola* hingegen wird überwiegend in Reinkultur isoliert.³¹

Die klinische Relevanz eines Nachweises hängt wesentlich vom mikrobiologischen Kontext ab. Ein Nachweis in Reinkultur bei signifikanter Keimzahl und passender klinischer Symptomatik spricht für eine ätiologische Bedeutung, während Mischkulturen auch eine Kolonisation oder Kontamination widerspiegeln können.^{1,9}

Beide Spezies sind mit invasiven Infektionen wie Bakteriämien und infektiöser Endokarditis assoziiert. Betroffen sind überwiegend ältere Patientinnen und Patienten mit urologischen Grunderkrankungen oder strukturellen Anomalien des Harntrakts.^{30,32–34}

Für *A. sanguinicola* liegen insgesamt weniger Daten vor, jedoch zeigen verfügbare Studien ähnliche klinische Muster, insbesondere bei älteren Männern mit urologischen Vorerkrankungen.² Im Vergleich zu *A. urinae* zeigt *A. sanguinicola* tendenziell höhere MHK-Werte und eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Trimethoprim und Fluorchinolonen, was die therapeutische Auswahl insbesondere oral verfügbarer Substanzen limitiert und die

Notwendigkeit von Alternativen unterstreicht.⁴

2.2 Die Gattung *Aerococcus*

Die Gattung *Aerococcus* gehört zur Familie der Aerococcaceae innerhalb der Ordnung Lactobacillales (siehe **Tabelle 1**) und wurde erstmals 1953 von Williams et al. beschrieben. Der neu vorgeschlagene Keim wurde aus Luft und Staub in überfüllten städtischen Umgebungen Londons isoliert, unter anderem in Schulklassen, Schuhfabriken und auf Straßen.³⁵ Die Autoren charakterisierten *Aerococcus* als kleine α -hämolytische Kolonien die kein Kettenwachstum zeigten. Die beschriebene Spezies wurde *Aerococcus viridans* genannt.³⁵ Aufgrund morphologischer Ähnlichkeit zu Streptokokken, Enterokokken und Staphylokokken kam es über Jahrzehnte hinweg zu häufigen Fehlidentifikationen und Verwechslungen mit diesen Gattungen.

Domäne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Klasse	Bacilli
Ordnung	Lactobacillales
Familie	Aerococcaceae
Gattung	<i>Aerococcus</i>
Art/Spezies	<i>Aerococcus urinae</i> <i>Aerococcus sanguinicola</i>

Tabelle 1. Taxonomie der Aerokokken

Aerococcus spp. sind Gram-positive, katalase-negative Kokken. Sie zählen nach EUCAST zu den anspruchsvollen Mikroorganismen. Ihr Wachstum ist langsam und erfordert in der Regel eine CO₂-angereicherte Atmosphäre sowie nährstoffreiche Medien. In den relevanten EUCAST Dokumenten und der Fachliteratur werden sie daher „*fastidious organisms*“ genannt.³⁶ Für die Resistenztestung empfiehlt EUCAST das speziell für anspruchsvolle Erreger entwickelten Mueller-Hinton-Fastidious-Mediums (MH-F). Dieses Medium besteht aus Mueller-Hinton-Agar bzw. -Bouillon mit 5 % defibriniertem Pferdeblut und 20 mg/L β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (β -NAD), wie in den offiziellen EUCAST Media Preparation Guidelines beschrieben.³⁷

Da diese morphologischen Ähnlichkeiten Keime der normalen Schleimhautflora betreffen und hier eine Differenzierung erschweren, wurde den Aerokokken über lange Zeit keine klinische Bedeutung beigemessen. Erst ab den 1980er Jahren wurde im Rahmen mikrobiologischer Studien in Dänemark ein bislang unerkannter Erreger aus Urinproben von Personen mit

Harnwegsinfektionen regelmäßig isoliert. Diese sogenannten „Aerococcus-like organisms“ (ALO) unterschieden sich von *A. viridans*, und wurden deshalb als eigenständige Bakterienart beschrieben.^{38,39} Die definitive Beschreibung und Benennung erfolgte 1992 durch Aguirre und Collins, die diese Spezies basierend auf 16S-rRNA-Analysen als *Aerococcus urinae* klassifizierten.⁴⁰

Im Jahr 2001 wurde durch Lawson et al. eine weitere Spezies beschrieben: *Aerococcus sanguincola*. Dieser Keim wurde erstmals aus menschlichem Blut isoliert und ebenfalls durch 16S-rRNA-Sequenzierung als eigenständige Spezies innerhalb der Gattung identifiziert.⁴¹

Aerococcus-Spezies zeigen auf Blutagar eine ausgeprägte α -Hämolyse (siehe **Abbildung 1**). Das Wachstum erfolgt bevorzugt bei 35–37 °C auf angereicherten Medien in CO₂-atmosphärischer Umgebung. Kolonien sind meist klein, grau-weiß, glatt.

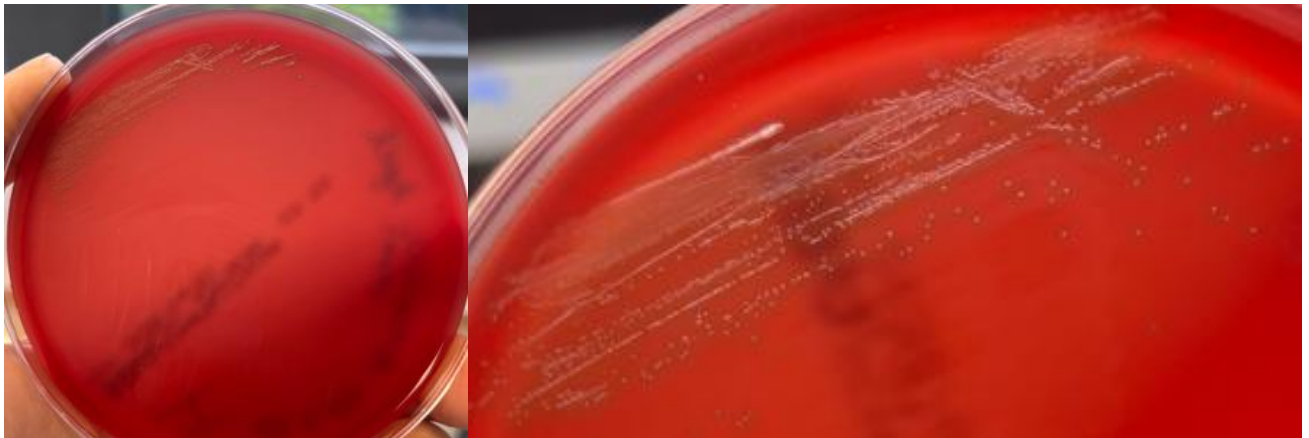


Abbildung 1. Typische Koloniemorphologie von *Aerococcus* spp. auf Blutagarplatte. Links: Übersicht der Kolonien auf der Agarplatte. Rechts: Vergrößerte Darstellung der Kolonien. Foto A.Ahmadzada

Ein wesentliches diagnostisches Problem ist die mikroskopische und kulturelle Ähnlichkeit von *Aerococcus*-Spezies zu anderen Gram-positiven Kokken. Im Grampräparat erscheinen sie typischerweise in Tetraden oder Clustern (siehe **Abbildung 2**), was leicht mit der Anordnung von *Staphylococcus* spp. verwechselt werden kann. Diese sind zwar ebenfalls haufenförmig angeordnet, jedoch katalase-positiv. Gleichzeitig erinnern Kolonieform, Farbe und α -Hämolyse auf Blutagar stark an *Streptococcus viridans*. Auch *Enterococcus*-Spezies kommen als Differenzialdiagnose infrage, da sie ähnliche Kolonien bilden und katalase-negativ sind. Ohne gezielte Diagnostik ist eine sichere Unterscheidung zwischen diesen Gattungen nicht möglich.

Erst durch moderne Verfahren wie die MALDI-TOF MS sowie durch 16S-rRNA-Analysen ist eine zuverlässige Identifikation möglich geworden.

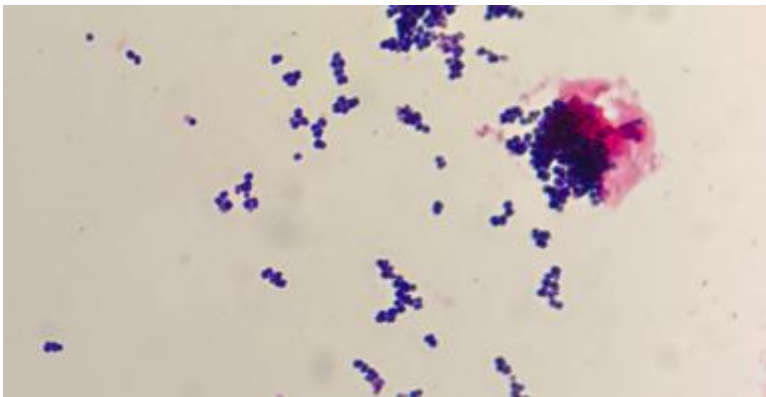


Abbildung 2. Mikroskopisches Bild eines Grampräparats von *Aerococcus* spp. Foto von A.Ahmadzada

Weitere beschriebene Spezies der Gattung *Aerococcus* sind:

- ***Aerococcus viridans***: Der Typstamm der Spezies (ATCC 11563) ist der Referenzstamm, der zur taxonomischen Definition der Art herangezogen wird. Er wurde ursprünglich aus der Luft isoliert und ist weit verbreitet in Umweltproben. Eine humanpathogene Bedeutung wird nur selten beschrieben, kann jedoch gelegentlich bei Endokarditis oder Bakteriämien nachgewiesen werden.⁴
- ***Aerococcus christensenii***: Diese Spezies wurde primär aus Vaginalabstrichen isoliert. Eine Rolle als Pathogen ist bisher nicht eindeutig belegt, und sie wird eher als Besiedler betrachtet.³
- ***Aerococcus urinaeequi***: Die Spezies wird hauptsächlich bei Pferden nachgewiesen, insbesondere im Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen. Eine humanpathogene Relevanz ist bislang nicht belegt.⁴²
- ***Aerococcus suis* und *Aerococcus urinaehominis***: Es handelt sich um relativ neu beschriebene Spezies, die derzeit nur in wenigen Studien erwähnt werden. Ihr pathogenes Potenzial für den Menschen ist nicht abschließend geklärt und steht derzeit im Fokus der mikrobiologischen Forschung.^{41,43}

2.3. Testmethoden

In der mikrobiologischen Diagnostik zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika kommen verschiedene standardisierte Verfahren zum Einsatz. Zwei etablierte Methoden, die auch in unserer Studie Anwendung fanden, sind die auf der Agardiffusion basierende Diskdiffusion (auch bekannt als Kirby-Bauer-Methode) sowie die Agardilution zur Bestimmung der MHK. Beide Verfahren sind Bestandteil der Empfehlungen des EUCAST und wurden gemäß den gültigen EUCAST-Empfehlungen (Version 11.0) durchgeführt.³⁷

Agardiffusion (Disk-Diffusion):

Die Agardiffusion ist eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit bakterieller Erreger. Das Verfahren beruht auf der Diffusion eines Antibiotikums aus einem imprägnierten Filterpapierplättchen (Disk) oder einem Streifen mit Konzentrationsgradient (z. B. E-Test®) in ein festes Nährmedium, üblicherweise Mueller-Hinton-Agar.

Die Bakterien werden zuvor standardisiert auf der Agaroberfläche ausplattiert (z.B. quantifiziertes Inokulum entsprechend 0,5 McFarland Standard), sodass nach Inkubation ein gleichmäßiger Bakterienrasen entsteht. Während der Inkubation diffundiert das Antibiotikum in den Agar und bildet eine Konzentrationsabnahme vom Applikationspunkt nach außen. Dort, wo die Konzentration des Wirkstoffes das Wachstum des Erregers hemmt, entsteht eine sichtbare Hemmzone. Der Durchmesser dieser Hemmzone wird nach einer standardisierten Inkubationszeit (meist 16 bis 20 Stunden bei 35 bis 37 °C) gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der von EUCAST (Version 11.0) definierten Breakpoints, die für viele Erreger-Wirkstoff-Kombinationen regelmäßig aktualisiert werden (siehe **Abbildung 3**).⁴⁴

Neben der klassischen Disk-Diffusion umfasst die Agardiffusion auch Verfahren wie den MHK-Gradiententest, bei dem ein Streifen mit definiertem Konzentrationsgradient des Antibiotikums auf die beimpfte Agarplatte gelegt wird. Im Gegensatz zur Disk-Diffusion ermöglicht diese Methode die direkte Ablesung einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) an der Stelle, an der das bakterielle Wachstum die Skala des Teststreifens schneidet.

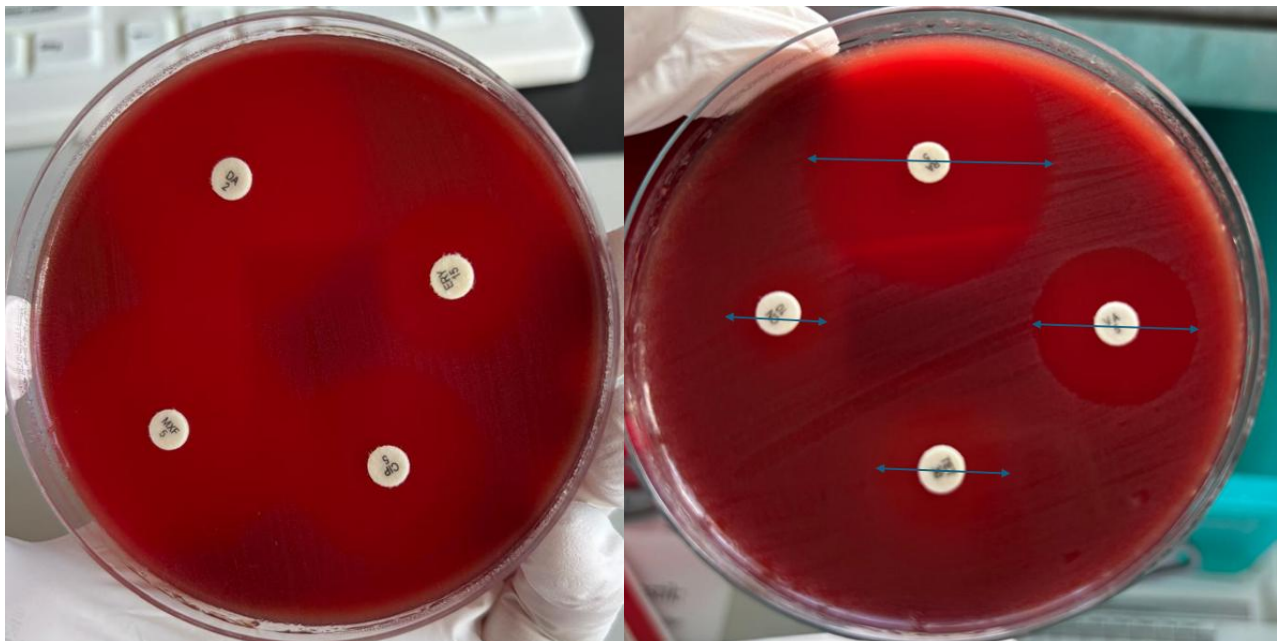


Abbildung 3. Agardiffusionstest (links) mit Hemmhofdurchmesser (rechts). Foto: A. Ahmadzada

Agardilution:

Die Agardilution ist ein quantitatives Verfahren zur präzisen Bestimmung der MHK eines Antibiotikums. Die Methode zeichnet sich durch eine besonders hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aus, da definierte Wirkstoffkonzentrationen direkt im Agar vorliegen und standardisierte Inokula eines Mikroorganismus aufgetragen werden. Im Gegensatz zur Diskdiffusion erlaubt die Agardilution eine exakte und vergleichbare Quantifizierung der MHK. Die Agardilution ist daher für Forschungsfragestellungen mit neuen oder nicht standardisierten Substanzen besonders geeignet und wird als Referenzmethode genutzt.⁴⁵

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren als Referenzmethode eingesetzt. EUCAST definiert die Agardilution ausdrücklich als Referenzverfahren für ausgewählte Substanzen (z. B. Fosfomycin, Mecillinam) und für anspruchsvolle Mikroorganismen (z.B. *Neisseria gonorrhoeae*), wenn standardisierte Bouillon-Mikrodilutionsverfahren keine zuverlässigen Ergebnisse liefern.⁴⁶ Frühere Studien konnten zeigen, dass die Agardilution bei *Aerococcus* spp. für Fluorchinolone zuverlässigere Resultate liefert als andere Methoden.⁴⁷ Hierzu liegen unter anderem *in vitro* Daten aus Kölner Studien der Autoren F. Fuchs und A. Hamprecht vor, die zur Etablierung der in dieser Studie angewandten Testmethoden beigetragen haben und in deren Rahmen das Anwenden des Methodenspektrums dieser Dissertationsschrift erarbeitet werden konnte.⁴⁸

In der vorliegenden Arbeit wurde die Agardilution zur Testung von Nitroxolin gegen *A. urinae* und *A. sanguinicola* etabliert, da für diese Substanz derzeit keine standardisierten Bewertungskriterien nach EUCAST für *Aerococcus* spp. vorliegen. Zusätzlich wurden die mittels Diskdiffusion bestimmten Hemmhofdurchmesser mit den ermittelten MHK-Werten verglichen. Damit stellt die vorliegende Untersuchung die erste Anwendung dieser Methode für Nitroxolin bei *Aerococcus*-Isolaten nach EUCAST-Standards dar.⁴⁹

In diesem Verfahren wird das Antibiotikum in definierten Konzentrationen in Agarplatten eingearbeitet. Für die Herstellung der Nitroxolin-haltigen Agarplatten wurde reines Nitroxolin-Pulver (Rosen Pharma, St. Ingbert, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gelöst und in einer Reihe zweifacher, serieller Verdünnungen hergestellt. Diese Verdünnungen deckten einen Konzentrationsbereich von 0,06 mg/L bis 128 mg/L ab (siehe **Abbildung 4**). Anschließend wurden die jeweiligen Verdünnungen in noch flüssigen, temperierten Mueller-Hinton-Agar eingemischt, der zuvor mit 5 % defibriniertem Pferdeblut und β -NAD supplementiert wurde. Diese Zusätze sind laut EUCAST notwendig, um

das Wachstum von anspruchsvollen Erregern wie *Aerococcus* spp. zuverlässig zu ermöglichen.³⁷

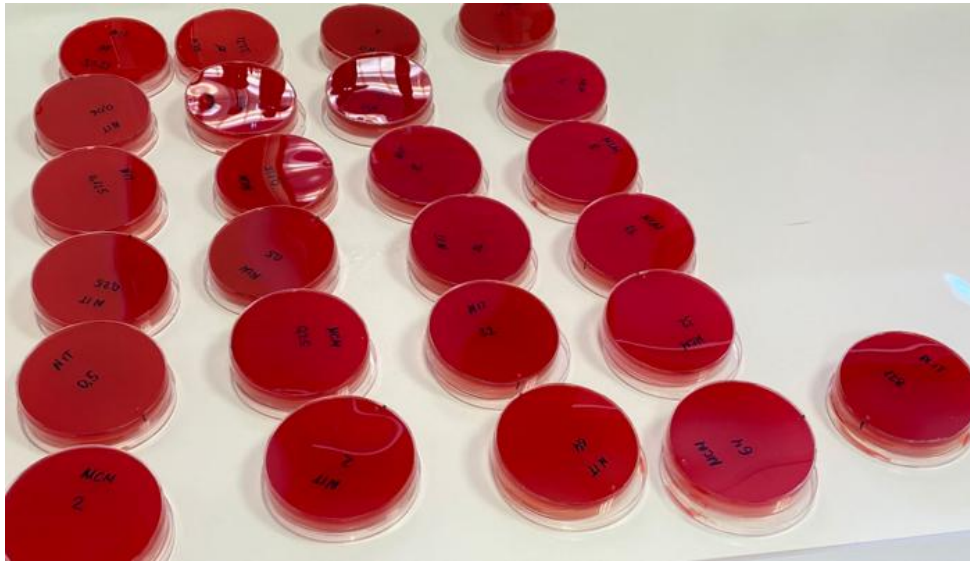


Abbildung 4. Serielle Verdünnung bei der Agardilution. Foto: A. Ahmadzada

Leere Petri-Schalen wurden mit flüssigem, temperiertem Mueller-Hinton-Agar befüllt, der mit 5 % defibriertem Pferdeblut und β -NAD supplementiert war. Durch Einarbeitung definierter Mengen einer Nitroxolin-Stammlösung entstanden Agarplatten mit steigenden Antibiotikakonzentrationen (0,06–128 mg/L).

Die Verwendung serieller Verdünnungen liefert eine exakte Bestimmung des MHK-Werts, da auf diese Weise jede Agarplatte nur eine definierte Konzentration des Antibiotikums enthält (siehe **Abbildung 4**). So kann der Konzentrationspunkt ermittelt werden, bei dem das Wachstum des getesteten Bakteriums gerade noch vollständig gehemmt wird, also die MHK. Nach Aushärtung der Platten erfolgte die punktuelle Beimpfung mit einer standardisierten Bakteriensuspension. Die Zelldichte wurde gemäß dem international etablierten 0,5 McFarland-Standard eingestellt, entsprechend etwa $1,5 \times 10^8$ KBE/mL. Die Trübung der Suspension wurde anhand eines Referenzröhrchens mittels photometrischer Dichtebestimmung bei einer Wellenlänge von 625 nm angepasst, bis die optische Dichte der Suspension möglichst exakt einem Zielwert von 0,5 McFarland entsprach. Der McFarland-Standard gewährleistet eine einheitliche Ausgangsbelastung bei Empfindlichkeitstestungen und ist entscheidend, um reproduzierbare und zwischen verschiedenen Laboren vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Anschließend wurde die Suspension im Verhältnis 1:10 verdünnt, sodass ein Arbeitsinokulum von ca. $1,5 \times 10^7$ KBE/ml erreicht wurde. Durch die Aufbringung von 1–2 μ l dieser Verdünnung ergaben sich pro Spot etwa 10^4 koloniebildende Einheiten (siehe **Abbildung 5**).

Nach 24-stündiger Inkubation bei 35 °C in CO₂-angereicherter Atmosphäre wurde jede Platte visuell auf sichtbares Wachstum kontrolliert. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Wachstum mehr erkennbar war, wurde als MHK definiert. Die Bestimmungen wurden für alle Isolate durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Die Agardilution, obwohl aufwändiger als andere Verfahren, erlaubt eine präzise und reproduzierbare Quantifizierung

der Antibiotikaaktivität und war daher für die Untersuchung der Nitroxolin-Wirksamkeit gegen *Aerococcus* spp. besonders geeignet.

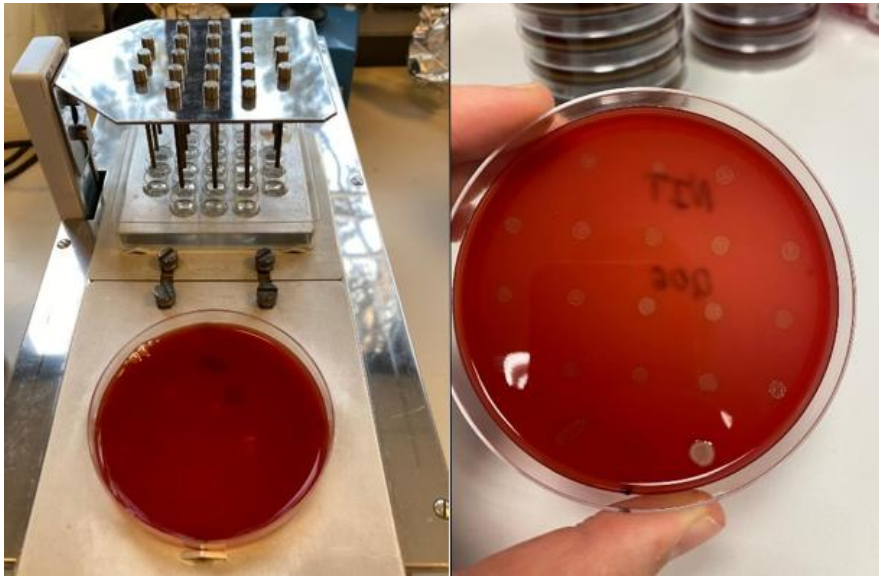


Abbildung 5. Durchführung der Agardilution mit Multipoint Inoculator Foto: A.Ahmadzada

Links: Multipoint Inoculator zur standardisierten Übertragung der Inokula. Die mit der Bakteriensuspension benetzten Edelstahlstifte übertragen definierte Volumina (ca. 1–2 µl) in einem festen Raster auf die Agaroberfläche, wodurch pro Platte gleich große Inokulationspunkte mit etwa 10^4 KBE pro Spot entstehen.

Rechts: Mit Nitroxolin versetzte Agarplatte mit punktförmigen Inokulationsstellen nach Bebrütung. Jede Position entspricht einem Isolat über die gesamte Verdünnungsreihe, Kontrollstämme sind mitgeführt. Die minimale Hemmkonzentration wird als niedrigste Antibiotikakonzentration ohne sichtbares Wachstum an der jeweiligen Position bestimmt.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte gemäß den EUCAST-Grenzwerten. Diese definieren für bestimmte Erreger-Antibiotikum-Kombinationen spezifische Grenzwerte in Form von Hemmhofdurchmessern (Diskdiffusion) oder MHK-Werten in mg/L (Agardilution). Anhand dieser Breakpoints wird ein Isolat als sensibel (S), sensibel bei erhöhter Exposition (I) oder resistent (R) eingestuft.

Zur Qualitätssicherung mikrobiologischer Empfindlichkeitstests ist der Einsatz standardisierter Kontrollstämme essenziell. Diese stammen in der Regel aus der American Type Culture Collection (ATCC) und dienen der Überprüfung von Medien, Reagenzien und Methodik. EUCAST gibt spezifisch für diese Kontrollstämme Zielwerte und Zielwertbereiche vor, die bei der Überprüfung der Empfindlichkeitstestung zu Qualitätssicherung herangezogen werden können. Typische Kontrollorganismen umfassen unter anderem:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Zur internen Qualitätskontrolle wurde in allen Testreihen *E. coli* ATCC 25922 eingesetzt, für den etablierte Qualitätskontrollbereiche für Nitroxolin vorliegen.

Da für *Aerococcus* spp. bislang keine entsprechenden Kontrollbereiche definiert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit geprüft, ob der für *E. coli* ATCC 25922 festgelegte Quality-Control-(QC)-Bereich unter den für Aerokokken erforderlichen Testbedingungen reproduzierbar ist.⁵⁰

Um die Übertragbarkeit des für Enterobacterales etablierten Qualitätskontrollbereichs auf Testbedingungen für anspruchsvolle Organismen zu evaluieren, wurden vor Beginn der eigentlichen Isolattestung mehrere Vergleichsreihen durchgeführt. Dabei wurde *E. coli* ATCC 25922 parallel unter Standardbedingungen sowie gemäß dem Protokoll für anspruchsvolle Organismen, also unter Zusatz von Pferdeblut und weiteren Supplementen sowie unter CO₂-Bebrütung, getestet. In diesen Vergleichsreihen lagen die für Nitroxolin bestimmten MHKs in beiden Ansätzen innerhalb des erwarteten Qualitätskontrollbereichs und zeigten keine relevanten Abweichungen. Auf dieser Grundlage wurde *E. coli* ATCC 25922 als geeigneter QC-Stamm für das in dieser Arbeit eingesetzte Agardilutionsverfahren ausgewählt und anschließend in jedem Agardilutionslauf mitgeführt.

Die Durchführung der Agardilution mit dem Multipoint Inoculator und das typische Wachstum des Kontrollstammes sind in **Abbildung 5** dargestellt; der dort sichtbare schleimiger Fleck im rechten unteren Bereich der Agarplatte dokumentiert das kräftige Wachstum von *E. coli* und belegt die korrekte Funktion der Methode. Durch den Einsatz des ATCC-Kontrollstammes konnte die Verlässlichkeit der Nitroxolin-Testungen sichergestellt und die Ergebnisse der *Aerococcus*-Isolate methodisch abgesichert werden.

Die Kombination aus Agardiffusion und Agardilution ermöglichte eine differenzierte und methodisch belastbare Analyse der Antibiotikaempfindlichkeit. Dabei diente die Agardilution als Referenzmethode zur Bestimmung quantitativer MHK-Werte. Es zeigte sich, dass hohe MHK-Werte mit kleinen Hemmhofdurchmessern korrelierten, während niedrige MHK-Werte mit größeren Hemmhöfen assoziiert waren, was die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich stärkt.

2.4. Getestete Antibiotika

In der vorliegenden Arbeit wurde die Empfindlichkeit von *A. urinae* und *A. sanguincola* gegenüber den von EUCAST für diese Spezies definierten Standardantibiotika untersucht.⁴⁴ Dazu zählten Benzylpenicillin, Ampicillin, Meropenem, Ciprofloxacin, Rifampicin, Vancomycin sowie Nitrofurantoin. Ergänzend wurde Nitroxolin getestet, da für dieses in Deutschland eine Zulassung zur oralen Therapie der unkomplizierten Harnwegsinfektion besteht, bisher jedoch keine Daten für *Aerococcus* spp. vorlagen.

Benzylpenicillin (Penicillin G) und Ampicillin sind Beta-Laktam-Antibiotika und wirken bakterizid durch Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese. Beide Substanzen zeigen eine

hohe *in vitro* Aktivität gegenüber *A. urinae* und werden in der Literatur als therapeutische Optionen bei invasiven Infektionen beschrieben (z.B. Endokarditiden). Für Benzylpenicillin liegen klinische Daten vor, die seinen Einsatz insbesondere bei aerokokkenbedingter Endokarditis unterstützen.⁵¹ Ampicillin wird als strukturell verwandtes Aminopenicillin in klinischen Fallserien und Einzelfallberichten ebenfalls als mögliche Therapieoption bei invasiven *Aerococcus*-Infektionen beschrieben, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Aminoglykosiden.^{17,51–53} Nach EUCAST (Version 11.0) gelten für Aerokokken für beide Substanzen identische klinische Grenzwerte ($S \leq 0,125$ mg/L für die MHK bzw. $S \geq 20$ mm im Agardiffusionstest).

Meropenem ist ein Carbapenem mit breitem Wirkspektrum und wird in der klinischen Praxis als Reserveantibiotikum gegen multiresistente Erreger eingesetzt. Aerokokken sind *in vitro* vollständig empfindlich, der klinische Einsatz ist aufgrund des sehr breiten Spektrums jedoch auf schwere invasive Infektionen beschränkt. Der EUCAST-Grenzwert (Version 11.0) für Aerokokken liegt bei $S \leq 0,25$ mg/L (MHK, $S \geq 31$ mm (Hemmhofdurchmesser)).

Ciprofloxacin gehört zu den Fluorchinolonen und wirkt durch Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase. Es ist oral verfügbar und wurde früher häufig in der Therapie von Harnwegsinfektionen eingesetzt, wird jedoch wegen häufiger Nebenwirkungen (Tendopathien, neurologische Störungen) und zunehmender Resistenzen eingeschränkt empfohlen.⁸ Für Aerokokken liegt der EUCAST-Grenzwert (Version 11.0) bei $S \leq 2$ mg/L (MHK), $S \geq 21$ mm (Hemmhofdurchmesser).

Rifampicin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Rifamycine und hemmt die bakterielle RNA-Polymerase. Es wird vor allem in Kombinationstherapien bei Endokarditis oder Fremdkörperinfektionen eingesetzt, für die Therapie unkomplizierter Harnwegsinfektionen spielt es keine Rolle. Für Aerokokken definiert EUCAST (Version 11.0) einen Grenzwert von $S \leq 0,125$ mg/L (MHK) bzw. $S \geq 25$ mm (Hemmhofdurchmesser).

Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das die bakterielle Zellwandsynthese hemmt. Es ist für schwere Infektionen mit Gram-positiven Erregern, einschließlich Aerokokken, etabliert und wird intravenös verabreicht. Bei Endokarditis oder schwer verlaufenden Bakteriämien stellt es eine wichtige Reserveoption dar. Der EUCAST-Grenzwert (Version 11.0) für Aerokokken liegt bei $S \leq 1$ mg/L (MHK) bzw. $S \geq 16$ mm (Hemmhofdurchmesser).

Nitroxolin ist ein Hydroxychinolinderivat mit einem besonderen Wirkmechanismus, der auf Chelatbildung bei Metallionen und Störung intrazellulärer Enzyme beruht.⁵⁴ Es wird seit Jahrzehnten insbesondere in osteuropäischen Ländern zur Therapie unkomplizierter Harnwegsinfektionen eingesetzt und erreicht sehr hohe Urinkonzentrationen nach oraler Gabe.⁶ Für Aerokokken existieren keine spezifischen EUCAST-Grenzwerte; daher wurde in der vorliegenden Studie der für *E. coli* bei unkomplizierter Zystitis definierte Grenzwert als

Referenz herangezogen ($S \leq 16$ mg/L MHK bzw. $S \geq 15$ mm Hemmhofdurchmesser, EUCAST Version 11.0).

Das oral verfügbare Antibiotikum Nitrofurantoin wirkt durch unspezifische DNA-Schädigung bakterizid. Es erreicht hohe Konzentrationen im Urin, nicht jedoch im Serum, weshalb es ausschließlich zur Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfektionen eingesetzt wird. Für Aerokokken gilt nach EUCAST (Version 11.0) ein Grenzwert von $S \leq 64$ mg/L (MHK) bzw. $S \geq 14$ mm (Hemmhofdurchmesser).

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur *in vitro* Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen *Aerococcus* spp. zu gewinnen. Hierzu wurden geeignete Testverfahren etabliert und angewendet, um die Wirksamkeit von Nitroxolin bei *A. urinae* und *A. sanguinicola* zu untersuchen.

Im Zuge der Studie wurden im Detail die folgenden Fragestellungen betrachtet:

- Welche Empfindlichkeitsmuster zeigen *A. urinae* und *A. sanguinicola* gegenüber jenen Antibiotika, für die EUCAST spezifische Breakpoints und Testkriterien existieren (Ampicillin, Meropenem, Vancomycin, Rifampicin, Nitrofurantoin und Ciprofloxacin)?
- Lassen sich in klinischen Isolaten verminderte Empfindlichkeiten gegenüber den untersuchten Antibiotika beobachten und wie verteilen sich die MHK-Werte im Studienkollektiv (Isolate aus Urinproben des Großraumes Köln) verglichen mit Daten aus anderen Regionen?
- Ist Nitroxolin grundsätzlich in der Lage, das Wachstum von *A. urinae* und *A. sanguinicola* zu hemmen (*in vitro* aktiv)?
- Lassen sich mit dem Agardilutionsverfahren zuverlässige MHK-Werte bestimmen, welche eine differenzierte Aussage zur Empfindlichkeit von Aerokokken gegenüber Nitroxolin zulassen?
- Wie gut korrelieren die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Testverfahren (Agardilution und Agardiffusion) bei der Bestimmung der Nitroxolin-Empfindlichkeit von *Aerococcus*-Isolaten bzw. kann die schnell verfügbare Diskdiffusion in zukünftigen Studien zur Testung herangezogen werden, um aufwändige Referenzverfahren nicht oder nicht sofort durchführen zu müssen?

3. Publikation

Die folgende Veröffentlichung ist in Zusammenarbeit mit der AG Hamprecht am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene entstanden und wurde 2023 veröffentlicht in: Ahmadzada A, Fuchs F, Hamprecht A. Susceptibility of *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola* to Standard Antibiotics and to Nitroxoline. Microbiol Spectr. 2023;11(2):e02763-22. doi:10.1128/spectrum.02763-2



Susceptibility of *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola* to Standard Antibiotics and to Nitroxoline

Aysel Ahmadzada,^a  Frieder Fuchs,^{a,b}  Axel Hamprecht^{a,c,d}

^aInstitute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Medical Faculty and University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

^bDepartment of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Central Hospital Koblenz, Koblenz, Germany

^cGerman Centre for Infection Research (DZIF), Bonn-Cologne, Cologne, Germany

^dInstitute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

Aysel Ahmadzada and Frieder Fuchs contributed equally to this work. Author order was determined alphabetically.

ABSTRACT *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola* have been increasingly recognized as causative agents of urinary tract infection (UTI) during the last decade. Nitroxoline achieves high urinary concentrations after oral administration and is recommended in uncomplicated UTI in Germany, but its activity against *Aerococcus* spp. is unknown. The aim of this study was to assess the *in vitro* susceptibility of clinical *Aerococcus* species isolates to standard antibiotics and to nitroxoline. Between December 2016 and June 2018, 166 *A. urinae* and 18 *A. sanguinicola* isolates were recovered from urine specimens sent to the microbiology laboratory of the University Hospital of Cologne, Germany. Susceptibility to standard antimicrobials was analyzed by disk diffusion (DD) according to EUCAST methodology, nitroxoline was tested by DD and agar dilution. Susceptibility of *Aerococcus* spp. to benzylpenicillin, ampicillin, meropenem, rifampicin, nitrofurantoin, and vancomycin was 100% and resistance was documented only against ciprofloxacin (20 of 184; 10.9%). MICs of nitroxoline in *A. urinae* isolates were low (MIC_{50/90} 1/2 mg/L) while significantly higher MICs were observed in *A. sanguinicola* (MIC_{50/90} 64/128 mg/L). If the EUCAST nitroxoline breakpoint for *E. coli* and uncomplicated UTI was applied (16 mg/L), 97.6% of *A. urinae* isolates would be interpreted as susceptible while all *A. sanguinicola* isolates would be considered resistant. Nitroxoline demonstrated high activity against clinical *A. urinae* isolates, but low activity against *A. sanguinicola*. Nitroxoline is an approved antimicrobial for UTI and could be an alternative oral drug to treat *A. urinae* urinary tract infection, yet clinical studies are needed to demonstrate this potential *in vivo*.

IMPORTANCE *A. urinae* and *A. sanguinicola* have been increasingly recognized as causative agents in urinary tract infections. Currently, there are few data available on the activity of different antibiotics against these species and no data on nitroxoline. We demonstrate that clinical isolates in Germany are highly susceptible to ampicillin, while resistance to ciprofloxacin was common (10.9%). Additionally, we show that nitroxoline is highly active against *A. urinae*, but not against *A. sanguinicola*, which based on the presented data, should be considered intrinsically resistant. The presented data will help to improve the therapy of urinary tract infections by *Aerococcus* species.

KEYWORDS urinary tract infection, uUTI, intrinsic resistance, oral, MDR, 8-hydroxy-quinoline

Aerococcus spp. are fastidious Gram-positive cocci and have been recognized as emerging microbes in urinary tract infections (UTI), bacteremia, and endocarditis (1, 2). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has facilitated the identification and discrimination of *A. urinae* and

Editor Rebekah M. Martin, Laboratory Corporation of America Holdings

Ad Hoc Peer Reviewers  Kristen Smith, Duke University; Erik Senneby, Department of Clinical Sciences, Lund University;  Magnus Rasmussen, Lunds University

Copyright © 2023 Ahmadzada et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Axel Hamprecht, axel.hamprecht@uol.de.

The authors declare no conflict of interest.

Received 20 July 2022

Accepted 5 February 2023

Published 27 February 2023

TABLE 1 Susceptibility of *Aerococcus* spp.

Antibiotic	Susceptibility	
	<i>A. urinae</i>	<i>A. sanguinicola</i>
Ampicillin ^a	100% (166/166)	100% (18/18)
Meropenem ^a	100% (166/166)	100% (18/18)
Ciprofloxacin ^a	90.4% (150/166)	77.8% (14/18)
Rifampicin ^a	100% (166/166)	100% (18/18)
Vancomycin ^a	100% (166/166)	100% (18/18)
Nitrofurantoin ^a	100% (166/166)	100% (18/18)
Nitroxoline ^b	97.6% (162/166)	0% (0/18)

^aInterpreted according to EUCAST disk diffusion breakpoints for *A. urinae* and *A. sanguinicola*.^bInterpreted according to EUCAST breakpoints for *E. coli* (≤ 16 mg/L).

A. sanguinicola from other alpha-hemolytic species with similar colony morphology (3–5). Hence, the understanding of the significance of *Aerococcus* spp. in UTI has greatly improved. Additionally, reports from invasive infections with identification of aerococci as causative pathogens are increasing (6–8).

In 2017, EUCAST introduced clinical breakpoints for *A. sanguinicola* and *A. urinae*, which now encompass benzylpenicillin, ampicillin, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, vancomycin, rifampicin, and nitrofurantoin. However, for UTI treatment several limitations are obvious: Except for nitrofurantoin, none of the antimicrobials with defined breakpoints is currently recommended for oral empirical treatment of lower UTI. Benzylpenicillin and ampicillin are only useful for targeted therapy, similarly for fluoroquinolones, vancomycin, rifampicin, or carbapenems, which are usually avoided because of side effects and collateral damage. Susceptibility data for *Aerococcus* spp. is still scarce and resistance to currently available oral antimicrobials (such as fluoroquinolones and nitrofurantoin) has been reported, highlighting the need for alternative options (9).

Nitroxoline is a quinoline derivate (8-hydroxy-quinoline) that is structurally unrelated to any other antibiotic and was first described as an antimicrobial in 1954 (10). It has been rediscovered for the treatment of uncomplicated UTI (uUTI) and is recommended as a first-line drug in the German uUTI guideline (11). The mode of action is based on ion chelation with subsequent effects on enzymatic pathways and charges of cellular compartments of fungal and bacterial cells (12). Recently, activity of nitroxoline against emerging pathogens such as multidrug resistant Gram-negative pathogens, including carbapenemase producers, enterococci, staphylococci, and even drug resistant fungi and mycobacteria was demonstrated (13–19). High urine concentrations can be achieved after oral administration (standard dose 250 mg every 8 h) yet systemic concentrations are low, limiting its use to infections of the urinary tract (20).

The aim of the present study was to compare the susceptibility of *A. urinae* and *A. sanguinicola* clinical isolates from Germany according to EUCAST and to assess the potential of nitroxoline for the treatment of *Aerococcus* spp.

RESULTS

All aerococcal isolates tested in this study were susceptible to ampicillin, meropenem, vancomycin, nitrofurantoin, and rifampicin (Table 1). Resistance to ciprofloxacin was 16 of 166 (9.6%) in *A. urinae* and 4 of 18 (22.2%) in *A. sanguinicola*, $P = 0.11$ (Table 1).

MICs of nitroxoline in *A. urinae* isolates were low (MIC_{50/90} 1/2 mg/L, MIC range 0.25 to 64 mg/L, inhibition zone diameter (IZD) range 12 to 30 mm) while significantly higher MICs were observed in *A. sanguinicola* (MIC_{50/90} 64/128 mg/L, MIC range 32 to 128 mg/L, IZD range 6 to 13 mm) (Fig. 1). If the EUCAST nitroxoline breakpoint for *E. coli* and uncomplicated UTI was applied (16 mg/L), 97.6% (162/166) of *A. urinae* isolates would be interpreted as susceptible, compared to 0% (0/18) of *A. sanguinicola* isolates, $P < 0.0001$. Similarly, if disk diffusion inhibition zones were categorized using the EUCAST nitroxoline breakpoint for *E. coli* (15 mm), 163/166 (98.2%) of *A. urinae* isolates would be interpreted

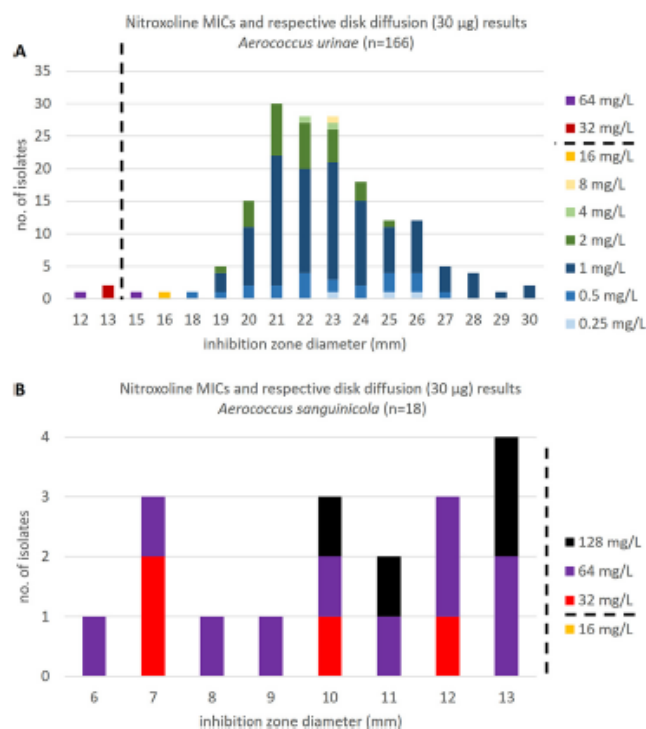


FIG 1 Histograms showing MICs of clinical *A. urinae* (A) and *A. sanguinicola* (B) isolates versus respective inhibition zone by disk diffusion. Dashed line indicates EUCAST recommended breakpoints for *E. coli*.

as susceptible and 3/166 (1.8%) as resistant (Fig. 1). Additional information on correlation of disk diffusion and MICs is provided in Fig. S1 and S2.

DISCUSSION

Urinary tract infections are a frequent cause for prescription of antibiotics in inpatients and outpatients, yet treatment has become more and more difficult with increasing antimicrobial resistance, especially in Gram-negative bacilli. Additionally, limited oral options are available for emerging microbes such as *Aerococcus* spp. (21). Moreover, the use of highly active agents, such as fluoroquinolones, has been restricted because of potential side effects (22, 23).

Therefore, old drugs such as nitroxoline, nitrofurantoin, and amdinocillin (mecillinam) have regained interest recently, since they show high activity against drug resistant pathogens and achieve high urinary concentrations after oral administration (11–20, 24, 25). Additionally, they are well tolerated, and ample experience is available with these drugs in different countries. Oskooi et al. (26) investigated aerococcal urinary tract infections and reported clinical success in all patients (100%) treated with amdinocillin, though microbiological success was only 33%. In contrast, the activity of nitroxoline against *A. urinae* has not been investigated previously.

Our study demonstrates the excellent *in vitro* activity of nitroxoline against *A. urinae* isolated from urinary specimens in a tertiary care center in Germany. If the current EUCAST breakpoint for *E. coli* (≤ 16 mg/L) was applied, 97.6% of *A. urinae* isolates would be considered susceptible to nitroxoline. Since oral antimicrobial options are limited for the treatment of *A. urinae*, nitroxoline could therefore be a useful alternative agent.

In contrast, activity of nitroxoline against *A. sanguinicola* was poor, indicating intrinsic resistance of this species to nitroxoline, which was demonstrated in both disk diffusion

and agar dilution. However, the small number of *A. sanguinicola* isolates limits the generalizability of this finding.

In another study, Scholtz et al. (27) demonstrated high susceptibility (97.8% to 100%) of *Aerococcus* spp. to benzylpenicillin, meropenem, linezolid, and vancomycin, but comparative lower susceptibility (56%) to levofloxacin on isolates from the United States. In this study, MICs were interpreted according to CLSI M45 breakpoints. In total, 134 *Aerococcus* isolates were tested using different commercially available susceptibility testing methods (gradient tests with different agars, Vitek2, BD Phoenix) and compared to broth microdilution as the CLSI-recommended reference method. The highest agreement with broth microdilution was observed for gradient tests on Mueller-Hinton agar with 5% sheep blood. In our study, an additional method was assessed (EUCAST disk diffusion), equally demonstrating high susceptibility of aerococci to standard antimicrobials when EUCAST breakpoints were applied, but a lower rate of resistance to fluoroquinolones (10.9%).

In the study of Roy et al. (28) on isolates from Canada, ciprofloxacin MICs ≥ 2 mg/L were recorded in 17.4% of isolates (I or R according to CLSI), which was more similar to the results from our study.

The present study investigated nitroxoline as an alternative treatment option with two different methodologies (disk diffusion and agar dilution). Overall correlation of inhibition zones and MICs was good, since isolates with high nitroxoline MICs showed small inhibition zones. However, only few *A. urinae* isolates with high nitroxoline MICs were available (4/166 isolates > 16 mg/L) and no *A. sanguinicola* isolate demonstrated low nitroxoline MICs, limiting interpretation of the correlation of the two methods. Also, more data on different MIC testing methods (e.g., agar dilution versus broth microdilution) for *Aerococcus* spp. are needed since superiority of agar dilution (as used in this study) was demonstrated for fluoroquinolones but not for other drugs previously (21, 28).

Nitroxoline resistance is still poorly understood and has rarely been described in clinical isolates. Molecular follow-up studies for comparison of genetic variations of *A. urinae* and *A. sanguinicola* should consider previously described mechanisms, such as efflux pumps (29).

Our study has several limitations. Not all isolates from the study period were available for analysis (e.g., were not stored initially or did not grow from frozen stock), which could limit the representativeness of our results. Furthermore, low MICs do not necessarily correlate with clinical or microbiological success *in vivo*. For nitroxoline, data on clinical outcome is still scarce and therapeutic failure has been described in geriatric patients for UTI caused by other organisms (30). Nevertheless, the activity displayed in the present study against *A. urinae* is promising, not only when applying the current EUCAST breakpoint (162/166 *A. urinae* ≤ 16 mg/L [97.6%]), but also when considering the pharmacokinetics of nitroxoline. High urinary concentrations after oral therapy have been demonstrated (5.4 mg/L of the unconjugated form and 210.6 mg/L of the conjugated form, yet the role of the conjugated form remains elusive) (20, 30). The fact that nitroxoline is an approved drug may facilitate *in vivo* studies and compassionate use, especially for uUTI.

Another limitation of the present study is the lack of clinical data, as we could not discriminate between asymptomatic bacteriuria and UTI as underlying conditions. This could lead to an overestimation of the uropathogenic potential of the isolates in our collection. Since most isolates were from inpatients from a tertiary care center, additional risk factors may be overrepresented compared to uncomplicated UTI for which nitroxoline is approved. Additionally, our patient population might not be comparable to other populations, e.g., from primary care, which could have an impact on the overall susceptibility. Although a recent study has investigated virulence factors of *Aerococcus* species isolated from UTI (31), more data on the correlation of clinical characteristics and outcome of aerococcal infections is needed.

To conclude, *A. urinae* isolates are highly susceptible against nitroxoline, in contrast to *A. sanguinicola* isolates, which can be considered intrinsically resistant. Nitroxoline

could be a useful alternative oral antibiotic for the treatment of uncomplicated UTI caused by *A. urinae*.

MATERIALS AND METHODS

Ethics approval. We declare that the study was conducted in accordance with guidelines outlined by the Declaration of Helsinki. For this study on bacterial isolates obtained as part of routine laboratory diagnostics, no patient consent or ethical approval was required according to the regulations of the University Hospital of Cologne.

Isolates. All isolates were grown from urine samples, which were sent for bacteriological analysis to the Institute of Medical Microbiology of the University Hospital of Cologne, a large tertiary care center in the western part of Germany. Isolates were characterized as part of routine diagnostics, based on national microbiology quality standards (32) and stored at -80°C in glycerol stocks. In the study period (December 2016 to June 2018), 30,718 urine samples from 17,570 patients were analyzed; of these, 312 grew *A. urinae/sanguinicola*. After removing duplicate isolates, 278 isolates remained. A total of 166 *A. urinae* and 18 *A. sanguinicola* nonduplicate isolates were available for our study, representing 66.2% of all *Aerococcus* spp. during the study period. Of these isolates, 82 were from voided midstream urine, 56 from catheterization, and 46 others. Most samples were from inpatients (121/184; 65.7% of isolates); of these, 93/184 (50.5%) were female and the median age was 77 years. For identification, MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik, Biotyper database 5.0, Bremen, Germany) was used. All isolates with a score ≥ 2.0 by Biotyper were included in the study.

Antimicrobial susceptibility testing. Susceptibility to ampicillin, meropenem, ciprofloxacin, vancomycin, and nitrofurantoin was determined by disk diffusion according to EUCAST methodology (21) on MH-F agar (Axonlab, Reichenbach, Germany). Antibiotic disks were obtained from i2a (Montpellier, France), except for nitroxoline 30 μg disks, which were purchased from MAST (Reinfeld, Germany).

Additionally, MICs were determined for nitroxoline using an agar dilution protocol for fastidious organisms, as previously described, and recommended by EUCAST (21, 28). Briefly, Mueller-Hinton (MH) agar was supplemented with defibrinated horse blood and other supplements according to EUCAST recommendations (33). Nitroxoline powder (Rosen Pharma, St. Ingbert, Germany) was dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and diluted into the agar plates in serial 2-fold dilutions to reach final concentrations of 0.06 mg/L to 128 mg/L. A suspension with an inoculum corresponding to 10^7 CFU/mL was prepared, and 1 μL was inoculated on the agar plates using an automated multipoint inoculator. Reading was carried out after incubation at 35°C for 24 h in a CO_2 enriched atmosphere. MICs were correlated with inhibition zone diameters (IZD) of disk diffusion testing.

Statistical analysis. Correlation of MICs and IZD was calculated by linear regression analysis using Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Statistical analysis of categorical data were performed using Fisher's exact test (two-sided). A P value of <0.05 was considered significant.

Data availability. The original contributions presented in the study are included in the article/supplemental material. The corresponding author may be contacted for additional information.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marco Schwabe and Andrea Stammegna for their kind support in preparation of the agar plates with horse blood. Pure nitroxoline powder was provided free of charge by Rosen Pharma.

F.F. has a clinician scientist position supported by the Deans office, Medical Faculty, University of Cologne.

Investigation, Writing - Original Draft, Review & Editing, A.A.; Project Administration, Isolate Collection, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, F.F.; Conceptualization, Supervision, Validation, Resources, Writing - Review & Editing, A.H.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, Korner B. 1991. *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *J Clin Microbiol* 29:1049–1053. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.5.1049-1053.1991>.
- Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL. 2005. Clinical significance of *Aerococcus urinae*: retrospective review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 53:289–292. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.021>.
- Cattoir V, Kobal A, Legrand P. 2010. *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scand J Infect Dis* 42:775–780. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.485576>.
- Senneby E, Nilson B, Petersson A, Rasmussen M. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is a sensitive and specific method for identification of aerococci. *J Clin Microbiol* 51:1303–1304. <https://doi.org/10.1128/JCM.02637-12>.
- Senneby E, Göransson L, Weiber S, Rasmussen M. 2016. A population-based study of aerococcal bacteraemia in the MALDI-TOF MS-era. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35:755–762. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2594-z>.
- Senneby E, Petersson AC, Rasmussen M. 2012. Clinical and microbiological features of bacteraemia with *Aerococcus urinae*. *Clin Microbiol Infect* 18:546–550. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03609.x>.

7. Sunnerhagen T, Nilsson B, Olaison L, Rasmussen M. 2016. Clinical and microbiological features of infective endocarditis caused by aerococci. *Infection* 44:167–173. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0812-8>.
8. Astudillo I, Sailler L, Porte LJ, Massip O, Arlet-Suau E. 2003. Spondylodiscitis due to *Aerococcus* urinae: a first report. *Scand J Infect Dis* 35:890–891.
9. Senneby E, Petersson A, Rasmussen M. 2015. Epidemiology and antibiotic susceptibility of aerococci in urinary cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 81:149–151. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.009>.
10. Petrov V, Sturgeon B. 1954. Some quinoline-5: 8-quinones. *J Chem Soc* 570–574. <https://doi.org/10.1039/JR9540000570>.
11. Kranz J, Schmidt S, Lebert C, Schneidewind L, Mandraka F, Kunze M, Helbig S, Vahlensieck W, Naber K, Schmiemann G, Wagenlehner FM. 2018. The 2017 update of the German clinical guideline on epidemiology, diagnostics, therapy, prevention and management of uncomplicated urinary tract infections in adult patients. part II: therapy and prevention. *Urol Int* 100: 271–278. <https://doi.org/10.1159/000487645>.
12. Sobke A, Makarewicz O, Baier M, Bär C, Pfister W, Gattermann SG, Pletz MW, Forstner C. 2018. Empirical treatment of lower urinary tract infections in the face of spreading multidrug resistance: in vitro study on the effectiveness of nitroxoline. *Int J Antimicrob Agents* 51:213–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.010>.
13. Fuchs F, Hamprecht A. 2019. Susceptibility of carbapenemase-producing Enterobacteriales (CPE) to nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 74:2934–2937. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz275>.
14. Fuchs F, Wille J, Hamprecht A, Parcina M, Lehmann C, Schwarze-Zander C, Seifert H, Higgins PG. 2019. In vitro activity of mecillinam and nitroxoline against *Neisseria gonorrhoeae* - re-purposing old antibiotics in the multi-drug resistance era. *J Med* 68:991–995. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001014>.
15. Abouelhasan Y, Yang Q, Yousaf H, Nguyen MT, Rolfe M, Schultz GS, Huigens RW. 3rd. 2017. Nitroxoline: a broad-spectrum biofilm-eradicating agent against pathogenic bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 49:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.017>.
16. Fuchs F, Becerra-Aparicio F, Xanthopoulou K, Seifert H, Higgins PG. 2022. In vitro activity of nitroxoline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from the urinary tract. *J Antimicrob Chemother* 74:2934–2937. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac123>.
17. Fuchs F, Aldeyeh AM, Hoffmann AM, Walther G, Kurzei O, Hamprecht A. 2022. In vitro Activity of nitroxoline in antifungal-resistant *Candida* species isolated from the urinary tract. *Antimicrob Agents Chemother* 66: e0226521. <https://doi.org/10.1128/aac.02265-21>.
18. Hoffmann AM, Wolke M, Rybníček J, Plum G, Fuchs F. 2022. In vitro activity of repurposed nitroxoline against clinically isolated mycobacteria including multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Pharmacol* 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.906097>.
19. Fuchs F, Hof H, Hofmann S, Kurzei O, Meis JF, Hamprecht A. 2021. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin Microbiol Infect* 27:1697.e7–1697.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.06.035>.
20. Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. 2018. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 73:2916–2926. <https://doi.org/10.1093/jac/dky255>.
21. EUCAST breakpoint table for bacteria (v 11.0), 2021. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf.
22. Quinolone- and fluoroquinolone-containing medicinal products. 2019. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/quinolone-fluoroquinolone-containing-medicinal-products>.
23. Golomb BA, Koslik HJ, Redd AJ. 2015. Fluoroquinolone-induced serious, persistent, multisymptom adverse effects. *BMJ Case Rep* 2015:bcr2015209821. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-209821>.
24. Fuchs F, Hamprecht A. 2019. Results from a prospective in vitro study on the mecillinam (amdinocillin) susceptibility of Enterobacteriales. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e02402-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02402-18>.
25. Fuchs F, Ahmadzade A, Plambeck L, Wille T, Hamprecht A. 2021. Susceptibility of clinical Enterobacteriales isolates with common and rare carbapenemases to mecillinam. *Front Microbiol* 11:627267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.627267>.
26. Oskooi M, Sunnerhagen T, Senneby E, Rasmussen M. 2018. A prospective observational treatment study of aerococcal urinary tract infection. *J Infect* 76:354–360. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.009>.
27. Scholtz SL, Faron ML, Buchan BW, Ledebore NA. 2022. Comparison of methods for determining the antibiotic susceptibility of *Aerococcus* Species in a clinical setting. *Am J Clin Pathol* 157:781–788. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab195>.
28. Roy FE, Berteau T, Bestman-Smith J, Lapierre SG, Dufresne SF, Domingo MC, Leduc JM. 2021. Validation of a gradient diffusion method (Etest) for testing of antimicrobial susceptibility of *Aerococcus* urinae to fluoroquinolones. *J Clin Microbiol* 59:e00259-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.00259-21>.
29. Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang PC, Andersson DL. 2020. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. *Antimicrob Chemother* 75:300–308. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz434>.
30. Forstner C, Kwetkat A, Makarewicz O, Hartung A, Pfister W, Fünfstück R, Hummers-Pradier E, Naber KG, Hagel S, Harrison N, Schumacher U, Pletz MW. 2018. Nitroxoline in geriatric patients with lower urinary tract infection fails to achieve microbiologic eradication: a noncomparative, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 24:434–435. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.007>.
31. Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, Dargis R, Rasmussen S, Skovgaard O, Fuursted K, Andersen PS, Stegger M, Christensen JJ. 2017. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog* 112:327–340. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.042>.
32. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. 2009. Cumitech 2C, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.
33. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect* 6:509–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse

Die vorliegende Studie liefert *in vitro* Daten zur Wirksamkeit von Nitroxolin gegen klinische Isolate von *A. urinae* und *A. sanguinicola* aus. Die untersuchten Isolate stammen aus einem mikrobiologischen Routinelabor eines universitären Zentrums und repräsentieren somit ein regionales Patientenkollektiv. Mangels etablierter EUCAST-Breakpoints für *Aerococcus* spp. erfolgte die Interpretation der Ergebnisse anhand des für *E. coli* bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen definierten Grenzwertes (≤ 16 mg/L bzw. ≥ 15 mm) als Orientierungsgröße. Die ermittelten Daten zur Empfindlichkeit bei bereits etablierten Substanzen (Ampicillin, Fluorchinolone etc.) lassen sich mit der aktuellen Literatur vergleichen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Nitroxolin aufgrund niedriger MHK eine geeignete Therapieoption gegen *A. urinae* darstellen könnte.

Demgegenüber lagen die deutlich höheren MHK-Werte von *A. sanguinicola* teilweise im Bereich oder oberhalb der erreichbaren Urinkonzentrationen, was auf eine eingeschränkte klinische Wirksamkeit hindeutet.

Etablierte Antibiotika

Alle untersuchten Isolate von *A. urinae* (n = 166) und *A. sanguinicola* (n = 18) waren *in vitro* empfindlich gegenüber Benzylpenicillin, Ampicillin, Meropenem, Vancomycin, Rifampicin und Nitrofurantoin. Resistenzen traten ausschließlich gegenüber Ciprofloxacin auf, mit einer Häufigkeit von 9,6 % (16/166) bei *A. urinae* und 22,2 % (4/18) bei *A. sanguinicola*.

Internationale Studien berichten vergleichbare, jedoch heterogene Resistenzraten. In einer Studie aus Kanada wurden Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin bei 17,4 % der *A. urinae*-Isolate beobachtet. Eine US-amerikanische Untersuchung berichtete hingegen über eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Levofloxacin bei bis zu 44 % der Isolate.^{47,55}

Diese Daten zeigen, dass Resistenzen gegen Fluorchinolone bei Aerokokken sowohl regional als auch substanzabhängig variieren. Die Vergleichbarkeit der Studien ist jedoch eingeschränkt, da unterschiedliche Testmethoden und Interpretationskriterien von EUCAST und CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) verwendet wurden. (siehe **Kapitel 5.2**). Die vorliegende Studie ergänzt diese Daten durch aktuelle Resistenzraten aus einem europäischen Kollektiv und liefert damit eine wichtige Grundlage für empirische Therapieentscheidungen. Abhängig von der jeweiligen Region kann der Einsatz von Fluorchinolonen zur Behandlung aerokokkenassoziierter Harnwegsinfektionen somit nicht nur aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils ungeeignet sein, sondern auch infolge der bestehenden Resistenzlage. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit alternativer oraler Therapieoptionen.

Nitroxolin

Die Ergebnisse zum Nitroxolin zeigen, dass *A. urinae* niedrige minimale Hemmkonzentrationen aufwies (MHK_{50/90} = 1/2 mg/L, MHK-Bereich 0,25–64 mg/L). Die gemessenen Hemmhofdurchmesser lagen zwischen 12 und 30 mm (siehe **Tabelle 2**). Bei Anwendung des von EUCAST (Version 11.0) für *E. coli* definierten Orientierungsbereichs wären 162 von 166 Isolaten (97,6 %) als sensibel einzustufen gewesen, während vier Isolate MHK-Werte oberhalb dieses Grenzwertes aufwiesen und entsprechend als resistent zu interpretieren waren.

Für *A. sanguinicola* ergab sich hingegen ein deutlich abweichendes Bild. Die Nitroxolin-MHKs lagen im hohen Bereich (MHK_{50/90} = 64/128 mg/L, MHK-Bereich 32–128 mg/L). Die gemessenen Hemmhofdurchmesser betrugen 6 bis 13 mm (siehe **Tabelle 2**).

Spezies (n)	MHK _{50/90} (mg/L)	MHK-Bereich (mg/L)	MHK >16 mg/L n (%)	Hemmhof <15 mm n (%)
<i>A. urinae</i> (166)	1 / 2	0,25-64	4 (2,4)	4 (2,4)
<i>A. sanguinicola</i> (18)	64/128	32-128	18 (100)	18 (100)

Tabelle 2. Ergebnisse der Agardilution und Agardiffusion für Nitroxolin bei *Aerococcus urinae* und *Aerococcus sanguinicola*. Dargestellt sind MHK-Bereich, MHK_{50/90} sowie die Übereinstimmung beider Testverfahren unter Anwendung des EUCAST-Orientierungswertes für *E. coli*.

Unter Verwendung desselben Referenzwerts wären alle Isolate (0/18) als resistent einzustufen gewesen. Der Unterschied zwischen den beiden Spezies war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Zwischen den beiden angewandten Testmethoden bestand eine sehr gute Übereinstimmung. Für *A. urinae* korrelierten niedrige minimale Hemmkonzentrationen mit großen Hemmhofdurchmessern. Hohe MHK-Werte gingen entsprechend mit kleinen Hemmhöfen einher. Grundlage der Bewertung war die Einordnung der Isolate gemäß den EUCAST-Orientierungswerten, wobei die Agardiffusion eine indirekte Abschätzung der MHK ermöglicht. Alle 162 als sensibel klassifizierten Isolate wurden in beiden Verfahren übereinstimmend als sensibel eingestuft. Auch bei *A. sanguinicola* ergaben sich in Agardilution und Agardiffusion konsistent hohe MHK-Werte und geringe Hemmhofdurchmesser, sodass alle Isolate als resistent bewertet wurden.

Es ist zu berücksichtigen, dass die Größe des untersuchten Kollektivs begrenzt war und insbesondere nur wenige *A. urinae*-Isolate mit erhöhten MHK-Werten vorlagen. Die beobachtete hohe Korrelation zwischen Agardilution und Agardiffusion sollte daher in zukünftigen Studien an größeren Kollektiven bestätigt werden.

Die Bestimmung der MHK von Nitroxolin erfolgte mittels Agardilution. Portal et al. zeigten am anspruchsvollen Mikroorganismus *Streptococcus agalactiae*, dass die Agardilution in mehr als 90 % der Fälle zu identischen Ergebnissen wie die Bouillon-Mikrodilution führt.⁵⁶ Gleichzeitig

wurden methodische Vorteile hervorgehoben, da die Agardilution das Auftreten von „trailing growth“ vermeidet und eine einfachere Erkennung von Kontaminationen ermöglicht. Der „trailing growth“ Effekt tritt häufig bei der Bouillon-Mikrodilution auf und beschreibt ein unscharfes oder stufenweises Bakterienwachstum in den Testreihen.⁵⁶ Dadurch lässt sich der exakte Punkt, an dem das Antibiotikum das Wachstum vollständig hemmt, nicht eindeutig bestimmen. Dies erschwert die Ablesung der minimalen Hemmkonzentration und kann zu methodisch bedingten Abweichungen führen. Auf Agarplatten tritt dieses Problem in deutlich geringerem Ausmaß auf, da das Wachstum klar zwischen „vorhanden“ und „nicht vorhanden“ differenziert werden kann.

Auf Grundlage unserer Arbeit kann angenommen werden, dass die Agardilution auch für andere anspruchsvolle Organismen wie Aerokokken ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der MHK darstellt. Auch Roy et al. zeigten, dass für *A. urinae* unter Anwendung der Agardilution eine gute Übereinstimmung mit Referenzmethoden sowie eine zuverlässige Beurteilung der Fluorchinolon-Empfindlichkeit erreicht werden kann.⁴⁷

Andere Studien mit Empfindlichkeitsdaten zu Nitroxolin bei *Aerococcus* spp. lagen nach eingehender Recherche nicht vor. Unsere Arbeit liefert somit die ersten systematischen Ergebnisse und zeigt eine klare Differenzierung zwischen den beiden Spezies.

Dieser bislang nicht beschriebene, signifikante speziesabhängige Unterschied im Empfindlichkeitsprofil legt nahe, dass bei *A. sanguinicola* intrinsische Resistenzmechanismen eine Rolle spielen könnten. Als mögliche Erklärungsansätze kommen unter anderem Effluxmechanismen oder eine reduzierte Permeabilität der bakteriellen Zellmembran in Betracht, weil vergleichbare Mechanismen bereits bei anderen Bakterien untersucht wurden.^{57,58} So konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass Mutationen mit einer verstärkten Expression der EmrAB-TolC-Effluxpumpe mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Nitroxolin assoziiert sind.⁵⁹ Auch bei schnell wachsenden Mykobakterien des *Mycobacterium abscessus* Komplexes war eine experimentell erzeugte eingeschränkte Wirksamkeit von Nitroxolin mit Effluxpumpen assoziiert.⁶⁰ Neuere Arbeiten an Gram-negativen Erregern weisen zudem darauf hin, dass RND-Effluxpumpen und Veränderungen der äußeren Membran eine wichtige Rolle bei der verminderten Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen, einschließlich Nitroxolin, spielen.⁶¹

Effluxpumpen stellen einen etablierten Mechanismus der bakteriellen Antibiotikaresistenz dar. Durch die Reduktion der intrazellulären Wirkstoffkonzentration führen sie häufig zu moderaten Erhöhungen der MHK und können zudem die Entwicklung weiterer Resistenzmechanismen begünstigen.⁶² Auch bei Gram-positiven Bakterien sind entsprechende Transportsysteme beschrieben, insbesondere Vertreter der Major-Facilitator-Superfamily sowie ATP-bindende Kassetten-Transporter.⁶³

Inwieweit sich diese Mechanismen auf Gram-positive Bakterien wie Aerokokken übertragen lassen, ist jedoch unklar. Insgesamt ist die Datenlage zur Resistenzentwicklung gegenüber Nitroxolin bislang begrenzt. Weder sind etablierte molekulare Marker für eine Nitroxolin-Resistenz eindeutig definiert, noch liegen systematische Untersuchungen zur Verbreitung entsprechender Mechanismen bei unterschiedlichen Bakterienspezies vor.

Einige Studien weisen darauf hin, dass die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Nitroxolin mit einem Fitnessverlust der Bakterien verbunden ist. Zudem wurde im Tiermodell eine verminderte Virulenz beobachtet.⁶⁴ Dies legt nahe, dass eine Resistenzbildung zwar möglich ist, für die Bakterien jedoch mit Nachteilen einhergeht, die eine Etablierung in klinischen Populationen erschweren können.⁶⁴

Die genauen molekularbiologischen Grundlagen der beobachteten Resistenzphänomene sollten im Rahmen weiterführender Untersuchungen analysiert werden. Insbesondere könnten durch vergleichende Ganzgenomsequenzierungen (whole genome sequencing, WGS) von *A. urinae* und *A. sanguinicola* potenzielle Effluxpumpen, Veränderungen membranassoziierter Transportproteine sowie weitere bislang unbekannte Resistenzdeterminanten identifiziert werden. Intrinsische Resistenzen oder stark erhöhte MHK-Werte klinischer Isolate bezogen gegenüber Nitroxolin sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

4.2. Aerokokken-Breakpoints

Aufgrund der steigenden klinischen Bedeutung dieser Erreger haben sowohl EUCAST als auch CLSI in den vergangenen Jahren spezielle klinische Breakpoints für *A. urinae* und *A. sanguinicola* festgelegt.

Im Jahr 2017 führte EUCAST erstmals spezifische MHK- und Diskdiffusions-Grenzwerte für *Aerococcus* spp. ein. Grundlage hierfür bildeten zahlreiche *in vitro* erhobene Daten, die vor dem Hintergrund der zunehmenden klinischen Relevanz dieser Erreger in die Bewertung einbezogen wurden.^{47,55,65} Parallel dazu ermöglichte die Etablierung der zuverlässigen Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF MS eine sichere Identifizierung. Dennoch besteht weiterhin ein Mangel an standardisierten Therapieempfehlungen.

EUCAST definiert Breakpoints für folgende Substanzen: Penicillin, Amoxicillin, Ampicillin, Meropenem, Vancomycin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin, Nitrofurantoin und Rifampicin. Da für *Aerococcus* spp. keine spezifischen EUCAST-Breakpoints für Nitroxolin vorliegen, wurde in der vorliegenden Studie der für *E. coli* bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen definierte Grenzwert als Referenz herangezogen. Die Festlegung von Breakpoints durch EUCAST basiert dabei neben den *in vitro* bestimmten MHK-Verteilungen auch auf pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern sowie den am Infektionsort erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen. Der vergleichsweise hohe Grenzwert von 16 mg/L für Nitroxolin lässt sich dadurch erklären, dass nach oraler Applikation

hohe Konzentrationen im Urin erreicht werden, die für die Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfektionen entscheidend sind.

EUCAST empfiehlt für anspruchsvolle Erreger wie *Aerococcus* spp. ein spezielles Protokoll zur Empfindlichkeitsprüfung. Dieses sieht die Verwendung von Mueller-Hinton-Agar mit 5 % defibriniertem Pferdeblut sowie die Zugabe von β -NAD vor. Entsprechend wurde auch in der vorliegenden Arbeit vorgegangen.⁴⁹

CLSI publizierte seine Breakpoints in der M45-Guideline und definierte Grenzwerte unter anderem für Penicillin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Meropenem, Vancomycin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Tetrazyklin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Linezolid. Als Referenzmethode empfiehlt CLSI die Bouillon-Mikrodilution mit kationadjustiertem Mueller-Hinton-Bouillon, ergänzt durch 2,5 bis 5 % lysiertes Pferdeblut.^{66,67}

Während bei einzelnen Substanzen (z. B. Penicillin und Vancomycin) eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den beiden Gremien besteht, zeigen sich bei anderen Wirkstoffen relevante Unterschiede. Besonders deutlich wird dies bei Ciprofloxacin, wo EUCAST einen höheren Grenzwert (≤ 2 mg/L) akzeptiert als CLSI (≤ 1 mg/L).^{44,66,67} Beim Vergleich von Studien zur Resistenzlage von Aerokokken gegenüber Fluorchinolonen sind daher die jeweils zugrunde gelegten Interpretationskriterien (CLSI oder EUCAST) von besonderer Bedeutung. Nordamerikanische Untersuchungen, die Fluorchinolon-Empfindlichkeiten von *A. urinae* und *A. sanguinicola* unter Anwendung der CLSI-Referenzmethodik analysierten, berichten konsistent relevante Anteile verminderter Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen.^{65,68} Dabei wurden je nach Kollektiv und getesteter Substanz Nicht-Empfindlichkeitsraten von bis zu etwa einem Drittel der Isolate beschrieben.⁶⁸ Methodische Vergleichsstudien aus den USA zeigen zudem, dass alternative Testverfahren wie die Gradient-Diffusion die Fluorchinolon-Empfindlichkeit im Vergleich zur CLSI-Bouillon-Mikrodilution tendenziell überschätzen können.⁶⁸ Diese Daten verdeutlichen, dass sowohl die Wahl des Interpretationsstandards als auch der Testmethodik einen wesentlichen Einfluss auf die berichteten Resistenzraten haben. In unserer Studie lag die nach EUCAST interpretierte Ciprofloxacin-Resistenzrate bei 10,9 % und damit unter den in CLSI-basierten nordamerikanischen Studien berichteten Nicht-Empfindlichkeitsraten.⁴⁷ Dies lässt sich plausibel durch die Anwendung unterschiedlicher Grenzwerte und Referenzmethoden erklären. Vergleichbare deutschlandweite Daten zur Fluorchinolon-Resistenz bei Aerokokken liegen bislang nicht vor, sodass die vorliegenden Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Resistenzlage in diesem Setting leisten.

4.3. Limitationen

Trotz der ausführlichen Datenerhebung und der sorgfältigen Methodik weist unsere Arbeit einige Einschränkungen auf. Von insgesamt 278 *Aerococcus*-Isolaten aus dem

Studienzeitraum, ermittelt über die Auswertung des Laborinformationssystems konnten 184 Isolate (66,2 %) in die Untersuchung eingeschlossen werden. Die übrigen 94 Isolate (33,8 %) standen nicht zur Verfügung, da sie entweder initial nicht kryoasserviert worden waren oder sich aus gefrorenen Beständen nicht erneut anzüchten ließen. Dies könnte die Repräsentativität der Ergebnisse eingeschränkt haben. Darüber hinaus war die Anzahl der untersuchten *A. sanguinicola*-Isolate im Vergleich zu *A. urinae* deutlich geringer, was die Aussagekraft der Ergebnisse für diese Spezies limitiert und potenziell zu einer Verzerrung der beobachteten Resistenzraten führen kann.

Zudem bedeutet eine niedrige MHK nicht zwangsläufig, dass auch *in vivo* ein klinischer oder mikrobiologischer Therapieerfolg erzielt wird. Obwohl Nitroxolin seit langem zugelassen ist, liegen nur wenige aktuelle klinische Daten vor; viele Studien stammen aus den 1960er- bis 1990er-Jahren.⁶ Auch ist das Medikament nach wie vor in vielen Ländern nicht verfügbar. Therapieversagen bei Harnwegsinfektionen wurde in einem geriatrischen Patientenkollektiv beschrieben.⁶

Außerdem handelt es sich um eine mikrobiologische Studie mit klarem Fokus auf die Isolate und Testmethoden ohne Einbezug klinischer Daten. Eine Differenzierung zwischen asymptomatischer Bakteriurie und symptomatischer Harnwegsinfektion war daher nicht möglich, wodurch das Risiko einer Überschätzung des uropathogenen Potenzials besteht. Zudem stammte der Großteil der Proben von stationären Patientinnen und Patienten eines tertiären Versorgungszentrums. In diesem Kollektiv sind Risikofaktoren für komplizierte Verläufe häufiger vertreten als im ambulanten Bereich. Die untersuchte Patientenpopulation ist daher möglicherweise nicht direkt mit anderen Kollektiven, etwa in der Primärversorgung, vergleichbar, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränkt, da Nitroxolin nur für die unkomplizierte Harnwegsinfektion zugelassen ist. Obwohl erste Untersuchungen zu Virulenzfaktoren von *Aerococcus* spp. vorliegen, besteht weiterhin ein erheblicher Bedarf an klinischen Studien, die den Zusammenhang zwischen Patientenmerkmalen, Infektionsverlauf und Therapieerfolg genauer beleuchten.³⁶

Dennoch ist die in der vorliegenden Studie gegen *A. urinae* beobachtete Aktivität vielversprechend. Unter Anwendung des aktuellen EUCAST-Grenzwerts für *E. coli*, der die Pharmakokinetik von Nitroxolin mit hohen intraluminalen Konzentrationen in den Harnwegen berücksichtigt, wären fast alle *A. urinae* Isolate als sensibel einzuschätzen (162/166 *A. urinae* ≤ 16 mg/L [97,6 %]).

4.4. Ausblick

Die Ergebnisse der Studie liefern einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung des Resistenzprofils von *A. urinae* und *A. sanguinicola* und weisen insbesondere auf das Potenzial von Nitroxolin als orale Therapieoption bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen durch *A.*

urinae hin. Vor dem Hintergrund begrenzter oraler Alternativen, der aktuellen Empfehlung zum Verzicht auf Fluorchinolone sowie der zunehmenden Bedeutung multiresistenter Erreger erscheint Nitroxolin als vielversprechende Option.

Ein zentraler klinischer Ausblick dieser Arbeit besteht darin, dass nun prospektive Studien durchgeführt werden können, die den Einsatz von Nitroxolin bei Harnwegsinfektionen durch *A. urinae* systematisch untersuchen und mikrobiologische Parameter mit klinischen Endpunkten wie Symptomverlauf, mikrobiologischem Eradikationserfolg und Rezidivraten verknüpfen. Die bereits bestehende Zulassung Nitroxolins und die etablierten Empfehlungen aus nationalen Leitlinien zu Dosierung und Anwendung könnten ein solches Studiendesign erleichtern. Die hier etablierten Testverfahren ermöglichen dabei eine standardisierte Empfindlichkeitsprüfung als Grundlage für eine gezielte Therapieevaluation, inklusive des Einsatzes der allgemein verfügbaren Diskdiffusion als schnelles Verfahren zur Ermittlung der Empfindlichkeit.

Darüber hinaus ergeben sich aus mikrobiologischer Sicht neue Fragestellungen zum Wirkmechanismus von Nitroxolin und zu den Ursachen der ausgeprägten speziesabhängigen Unterschiede im Empfindlichkeitsprofil. Insbesondere für *A. sanguinicola* legen die Daten das Vorliegen intrinsischer Resistenzmechanismen nahe. Zukünftige Studien sollten daher molekulare Charakterisierungen verfolgen, um z.B. Effluxsysteme, Veränderungen der Zellmembran oder weitere genetische Determinanten der Nitroxolin-Resistenz zu identifizieren.

Solche Untersuchungen könnten zum besseren Verständnis der Nitroxolin-Wirkung und Nitroxolin-Resistenz bei unterschiedlichen Mikroorganismen beitragen.

4.5. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige *in vitro* Daten zur Empfindlichkeit von *A. urinae* und *A. sanguinicola* gegenüber verschiedenen Antibiotika und Nitroxolin erhoben werden. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Empfindlichkeit beider Spezies gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika, während Nitroxolin eine ausgeprägte Aktivität gegen *A. urinae*, jedoch nicht gegen *A. sanguinicola*, aufweist und somit als potenzielle orale Therapieoption ausschließlich für Infektionen durch *A. urinae* in Betracht kommen könnte.

5. Literaturverzeichnis

- 1 S3-Leitlinie Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei Erwachsenen (HWI) Version 3.0. https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-044I_S3_Epidemiologie-Diagnostik-Therapie-Praevention-Management-Harnwegsinfektionen-Erwachsene-HWI_2024-09.pdf.
- 2 Senneby E, Petersson A-C, Rasmussen M. Epidemiology and antibiotic susceptibility of aerococci in urinary cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; **81**: 149–51. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.009>
- 3 Cattoir V, Kobal A, Legrand P. *Aerococcus* *urinae* and *Aerococcus* *sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scand J Infect Dis* 2010; **42**: 775–80. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.485576>
- 4 Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.026>
- 5 Krajewski W, Łaskiewicz J, Tomczak W, et al. Nitroxoline: treatment and prevention of urinary tract infections from the urologist's perspective. *Cent European J Urol* 2024; **77**: 339–43. <https://doi.org/10.5173/cej.2024.17>
- 6 Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 628. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0628-7>
- 7 Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 2916–26. <https://doi.org/10.1093/jac/dky255>
- 8 BfArM. Rote-Hand-Brief. Wichtige Arzneimittelinformation zur Anwendung von Chinolone 08.04.2019.
- 9 EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Madrid, Spain 2025. ISBN 978-94-92671-29-5.
- 10 Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis* 2001; **183 Suppl 1**: S1–4. <https://doi.org/10.1086/318850>

- 11 Medina M, Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther Adv Urol* 2019; **11**: 1756287219832172.
<https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
- 12 Czajkowski K, Broś-Konopielko M, Teliga-Czajkowska J. Urinary tract infection in women. *Prz Menopauzalny* 2021; **20**: 40–47. <https://doi.org/10.5114/pm.2021.105382>
- 13 Storme O, Tirán Saucedo J, Garcia-Mora A, Dehesa-Dávila M, Naber KG. Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection. *Ther Adv Urol* 2019; **11**: 1756287218814382. <https://doi.org/10.1177/1756287218814382>
- 14 Hooton TM. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *N Engl J Med* 2012; **366**: 1028–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1104429>
- 15 Schito GC, Naber KG, Botto H, et al. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 407–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.04.012>
- 16 Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 269–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- 17 Tai DBG, Go JR, Fida M, Saleh OA. Management and treatment of *Aerococcus* bacteremia and endocarditis. *Int J Infect Dis* 2021; **102**: 584–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.096>
- 18 Yonetani S, Hirao C, Ohnishi H. Background of patients with *Aerococcus* spp. detected in blood cultures, and drug sensitivity of *Aerococcus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021; **101**: 115506. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115506>
- 19 Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 69–76. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg028>
- 20 Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- 21 Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* 2012; **2012**: 681473. <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
- 22 Robinson AE, Heffernan JR, Henderson JP. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiol* 2018; **13**: 745–56.
<https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>

- 23 Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2009; **77**: 2762–72. <https://doi.org/10.1128/IAI.00323-09>
- 24 Fowler JE. Secretory immunity of the prostate gland. *Infection* 1991; **19**: S131-S137. <https://doi.org/10.1007/BF01643682>
- 25 Alfouzan WA, Dhar R. Candiduria: Evidence-based approach to management, are we there yet? *J Mycol Med* 2017; **27**: 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.005>
- 26 Karlowsky JA, Hoban DJ, Decorby MR, Laing NM, Zhanel GG. Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance-Quinolone Resistance study. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2251–54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00123-06>
- 27 Flores-Mireles A, Hreha TN, Hunstad DA. Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 2019; **25**: 228–40. <https://doi.org/10.1310/sci2503-228>
- 28 Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, Vos MC, Janssens MM, Buiting AG. Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; **16**: 871–75. <https://doi.org/10.1007/BF01700552>
- 29 Wang D, Haley E, Luke N, et al. Emerging and Fastidious Uropathogens Were Detected by M-PCR with Similar Prevalence and Cell Density in Catheter and Midstream Voided Urine Indicating the Importance of These Microbes in Causing UTIs. *Infect Drug Resist* 2023; **16**: 7775–95. <https://doi.org/10.2147/IDR.S429990>
- 30 Senneby E, Petersson AC, Rasmussen M. Clinical and microbiological features of bacteraemia with *Aerococcus urinae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 546–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03609.x>
- 31 Sihvonen R, Turunen M, Lehtola L, et al. Clinical and microbiological characterization of *Aerococcus urinae* bacteraemias at Helsinki metropolitan area, Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2022; **41**: 751–60. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04415-6>
- 32 Yaban B, Kikhney J, Musci M, et al. *Aerococcus urinae* - A potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One* 2020; **15**: e0231827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231827>
- 33 Greco M, Rúa-Figueroa Í, Ghiglione S, Santana Medina E, Quevedo Abeledo JC, Rodríguez-Lozano C. Musculoskeletal infections caused by *Aerococcus urinae*: a case-based review. *Clin Rheumatol* 2018; **37**: 2587–94. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4072-8>

- 34 Astudillo L, Sailer L, Porte L, Lefevre JC, Massip P, Arlet-Suau E. Spondylodiscitis due to *Aerococcus urinae*: a first report. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**: 890–91.
<https://doi.org/10.1080/00365540310016664>
- 35 WILLIAMS RE, HIRCH A, COWAN ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol* 1953; **8**: 475–80. <https://doi.org/10.1099/00221287-8-3-475>
- 36 Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, et al. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog* 2017; **112**: 327–40.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.042>
- 37 Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. EUCAST, Version 7, January 1, 2022.
- 38 Christensen JJ, Korner B, Kjaergaard H. *Aerococcus*-like organism--an unnoticed urinary tract pathogen. *APMIS* 1989; **97**: 539–46. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1989.tb00828.x>
- 39 Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, Korner B. *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 1049–53.
<https://doi.org/10.1128/jcm.29.5.1049-1053.1991>
- 40 Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J Gen Microbiol* 1992; **138**: 401–05. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-2-401>
- 41 Lawson PA, Falsen E, Truberg-Jensen K, Collins MD. *Aerococcus sanguicola* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; **51**: 475–79.
<https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-475>
- 42 Felis GE, Torriani S, Dellaglio F. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; **55**: 1325–27. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63324-0>
- 43 Vela AI, García N, Latre MV, et al. *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; **57**: 1291–94.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64537-0>
- 44 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (ECUAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- 45 Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; **3**: 163–75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

- 46 Turnidge J. EUCAST_SOP_10.2_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20250512.
- 47 Roy FE, Berteau T, Bestman-Smith J, et al. Validation of a Gradient Diffusion Method (Etest) for Testing of Antimicrobial Susceptibility of *Aerococcus urinae* to Fluoroquinolones. *J Clin Microbiol* 2021; **59**: e0025921. <https://doi.org/10.1128/jcm.00259-21>
- 48 Fuchs F, Ahmadzada A, Plambeck L, Wille T, Hamprecht A. Susceptibility of Clinical Enterobacterales Isolates With Common and Rare Carbapenemases to Mecillinam. *Front Microbiol* 2020; **11**: 627267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.627267>
- 49 EUCAST. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. Version 7.0 January, 2022.
- 50 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST; **2018**.
- 51 Sunnerhagen T, Nilson B, Olaison L, Rasmussen M. Clinical and microbiological features of infective endocarditis caused by aerococci. *Infection* 2016; **44**: 167–73. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0812-8>
- 52 Figueroa Rodriguez F, Faieta Lasarcina A, Davila Grijalva F. Mitral Valve Endocarditis with Perforation from a Urinary Source: An Unusual Case and Literature Review. *Case Rep Cardiol* 2019; **2019**: 5496851. <https://doi.org/10.1155/2019/5496851>
- 53 Banerjee S, Murali S, Azhar A, Pathmanathan A, Chaudhuri D. *Aerococcus urinae* tricuspid valve infective endocarditis. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2022; **35**: 522–23. <https://doi.org/10.1080/08998280.2022.2054042>
- 54 Repac Antić D, Parčina M, Gobin I, Petković Didović M. Chelation in Antibacterial Drugs: From Nitroxoline to Cefiderocol and Beyond. *Antibiotics (Basel)* 2022; **11**. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081105>
- 55 Scholtz SL, Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Comparison of Methods for Determining the Antibiotic Susceptibility of *Aerococcus* Species in a Clinical Setting. *Am J Clin Pathol* 2022; **157**: 781–88. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab195>
- 56 Portal EAR, Farley C, Iannetelli T, et al. Agar-Dilution Is Comparable to Broth Dilution for MIC Determination in *Streptococcus agalactiae*. *Antibiotics (Basel)* 2025; **14**. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020156>
- 57 Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- 58 Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**: 629–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>

- 59 Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang P-C, Andersson DI. Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 300–08. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz434>
- 60 Hoffmann AM, Wolke M, Rybníček J, Plum G, Fuchs F. Activity of the old antimicrobial nitroxoline against *Mycobacterium abscessus* complex isolates. *J Glob Antimicrob Resist* 2023; **33**: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.02.010>
- 61 Cacace E, Tietgen M, Steinhauer M, et al. Uncovering nitroxoline activity spectrum, mode of action and resistance across Gram-negative bacteria. *Nat Commun* 2025; **16**: 3783. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58730-5>
- 62 Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- 63 Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist Updat* 2016; **27**: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>
- 64 Deschner F, Risch T, Baier C, Schlüter D, Herrmann J, Müller R. Nitroxoline resistance is associated with significant fitness loss and diminishes in vivo virulence of *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2024; **12**: e0307923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03079-23>
- 65 Humphries RM, Hindler JA. In vitro antimicrobial susceptibility of *Aerococcus urinae*. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 2177–80. <https://doi.org/10.1128/JCM.00418-14>
- 66 CLSI Guideline M45 W. M45-Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria 2016.
- 67 Maynard R, Manuel C, Simpkins S, et al. Development of disk diffusion susceptibility test methods for *Aerococcus* spp. and updates to Clinical and Laboratory Standards Institute MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2025; **63**. <https://doi.org/10.1128/jcm.00115-25>
- 68 Kling K, Menon A, Norconk P, Zhu D, Zembower T, Qi C. Evaluation of gradient diffusion in vitro susceptibility testing of *Aerococcus urinae*. *J Glob Antimicrob Resist* 2024; **38**: 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.07.014>

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Typische Koloniemorphologie von <i>Aerococcus</i> spp. auf Blutagarplatte.....	16
Abbildung 2. Mikroskopisches Bild eines Grampräparats von <i>Aerococcus</i> spp	17
Abbildung 3. Agardiffusionstest.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 4. Agardiffusionstest mit Hemmhofdurchmesser.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 5. Serielle Verdünnung bei der Agardilution.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 6. Durchführung der Agardilution mit Multipoint Inoculator.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Aerokokken	15
Tabelle 2. Ergebnisse der Agardilution und Agardiffusion für <i>Nitroxolin</i> bei <i>Aerococcus</i> <i>urinae</i> und <i>Aerococcus</i> <i>sanguinicola</i>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID) Lissabon.

April 2022: ePoster+Abstract.

Susceptibility of *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola* to Standard Antibiotics and to Nitroxolin.