

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

***In vitro* Empfindlichkeit von multiresistenten
Enterobakterien gegenüber Mecillinam, Temocillin
und Nitroxolin**

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

vorgelegt von
Lars Plambeck
aus Rendsburg

promoviert am 16. April 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. A. Hamprecht
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Dr. nat. med. J. Rybniker

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 Publikation, auf der diese Arbeit beruht, erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Hamprecht und der AG Hamprecht am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (IMMIH) der Universitätsklinik Köln.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung und unter kontinuierlicher Supervision durch Herrn Dr. Fuchs von mir selbst ausgeführt worden. Die Isolate stammen aus der Routinediagnostik der Klinik für Immunologie, Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln. Ich habe die Isolate selbst isoliert, subkultiviert und archiviert. Anschließend führte ich die verschiedenen Testverfahren durch, die ich selbst vorbereitet und ausgewertet habe. PCR-Testungen und Sequenzierungen erfolgten extern. Das Manuskript habe ich selbst entworfen.

Das Einreichen von ePoster und Publikation selbst erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Hamprecht. Textentwurf und Grafiken, sofern nicht anders angegeben, stammen aus meiner Hand. Die statistische Auswertung erfolgte in Absprache mit Herrn Prof. Dr. Hamprecht durch mich.

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 08.11.2023

Unterschrift: 

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hamprecht danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine stets gewährte Unterstützung. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frieder Fuchs für seine Anstrengungen im Labor, bei Susanne Detmer und Janko Sattler für ihre Korrekturen.

Bei meiner Freundin Leonie bedanke ich mich für die Geduld.

Widmung

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	7
2. Zusammenfassung	8
3. Einleitung	11
3.1. Harnwegsinfektionen	11
3.2. Enterobakterien	16
3.3. Getestete Antibiotika.....	19
3.4. Testverfahren.....	21
3.5. Auswahl des Studienkollektivs.....	25
3.6. Statistische Auswertung	26
3.7. Ziele der Arbeit	26
4. Publikation	27
5. Diskussion	35
5.1. Ergebnisse	35
5.2. Vergleich der Testverfahren	39
5.3. Limitationen	40
5.4. Ausblick	41
6. Literaturverzeichnis	42
7. Anhang	46
7.1. Abbildungsverzeichnis	46
7.2. Tabellenverzeichnis	46
7.3. Lebenslauf	47
8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen	48

1. Abkürzungsverzeichnis

3GC	Cephalosporine der III. Generation
AmpC	Ampicillinase C
BPs	Breakpoint(s) nach EUCAST
CPE	Carbapenemase-bildende Enterobakterien
EARS-net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ESBL	Extended-Spectrum- β -Lactamase
EUCAST	Europäisches Komitee für Antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen
HHD	Hemmhofdurchmesser
HWI	Harnwegsinfektion
I	Sensibel bei erhöhter Dosis/Exposition
IMMIH	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln
KPC	<i>Klebsiella-pneumoniae</i> -Carbapenemase
MDR	Multiresistent
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NDM	New-Delhi-Metallo- β -Laktamase
NRW	Nordrhein-Westfalen
OXA-48-like	Oxacillinasen
PBP2	Penicillin-bindendes-Protein 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Resistent
RKI	Robert-Koch-Institut
S	Sensibel
spp	Spezies
VIM	Verona-Integron-Metallo- β -Laktamase

2. Zusammenfassung

Ambulant erworbene, unkomplizierte Harnwegsinfektionen (HWI) stellen eine der häufigsten Infektionen im ambulanten Bereich dar, insbesondere bei Frauen.¹ Eine antiinfektive Therapie ist der rein symptomatischen Behandlung mit nicht-steroidalen Antirheumatika überlegen hinsichtlich der Symptomlinderung und Reduktion von Komplikationen.² Die antibiotische Therapie erfolgt zunächst kalkuliert und orientiert sich am vermuteten Erregerspektrum und der örtlichen Resistenzlage. Die kalkulierte Antibiotika-Therapie bezeichnet die Gabe von breit wirksamen Antibiotika, noch bevor ein Erregernachweis mit Antibiogramm vorliegt.

Enterobakterien sind die häufigsten Erreger von HWI. Die antibiotische Therapie wird allerdings durch die Zunahme von Resistenzen gegenüber gängigen Antibiotika erschwert.^{1,3}

Die deutsche S3-Leitlinie „Unkomplizierte Harnwegsinfektionen“ von 2017 empfiehlt für die initiale, kalkuliert Therapie der unteren unkomplizierten Harnwegsinfektion fünf Antibiotika als gleichwertige Erstlinientherapeutika: Fosfomycin-Trometamol, Nitrofurantoin, Pivmecillinam, Nitroxolin und Trimethoprim (letzteres nach lokaler Resistenzlage).¹ Entgegen der Leitlinienempfehlung werden im ambulanten Sektor noch immer häufig Fluorchinolone, auch für unkomplizierte HWI, verschrieben.⁴

Im stationären Setting wird bei schweren HWI außerdem das β -Laktamase-stabile Temocillin eingesetzt, das seit 2019 ebenfalls in Deutschland für u.a. komplizierte HWI zugelassen ist.^{5,6}

Auf Basis klinischer und mikrobiologischer Daten hat das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) *in vitro* Grenzwerte, bezogen auf Dosis und Empfindlichkeit, festgelegt. Diese Grenzwerte sind meist auf bestimmte Spezies und/oder auf unkomplizierte HWI beschränkt.

Für Mecillinam, Nitroxolin als auch Temocillin existieren bisher nur wenige Daten aus Deutschland zur Resistenzlage bei Enterobakterien. Diese Daten beschränken sich zudem vornehmlich auf multisensible *Escherichia coli* Isolate.⁷

In der vorliegenden Dissertation wurde die *in vitro* Empfindlichkeit multiresistenter Enterobakterien gegenüber Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin analysiert.

Hierzu wurden bakterielle Isolate aus der klinischen Urin-Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (IMMIH) Köln getestet. Das Kollektiv umfasste 394 multiresistente (MDR) Enterobakterien, die im Jahre 2019 isoliert wurden. Die Multiresistenz war definiert durch Resistenz gegenüber Cephalosporinen der III. Generation (3GC) und/oder Carbapenemen. Neben den typischen und häufigsten Erregern von Harnwegsinfektionen (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*) wurden weitere uropathogene MDR-Enterobakterien (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* und *Raoultella ornithinolytica*) eingeschlossen.¹ Im Falle von Carbapenemase-bildenden Enterobakterien (CPE) wurde diese genotypisch analysiert.

Hohe Empfindlichkeit gegenüber Mecillinam zeigten v.a. Isolate der Spezies *E. coli*, *Klebsiella aerogenes* und *Enterobacter* spp. mit Extended-spectrum β -Laktamase-Produktion (ESBL) und/oder Ampicillinase-C-Überexpression (AmpC). Bei CPE zeigte Mecillinam dagegen geringere Aktivität.

Ferner zeigten *P. mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae* Isolate, unabhängig vom Resistenzmechanismus, sowie ESBL-Produzenten allgemein eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Temocillin. Bei Vorliegen von *Klebsiella-Pneumoniae*-Carbapenemase (KPC) und Verona-Integron-Metallo- β -Laktamase (VIM-1) oder der New-Delhi-Metallo- β -Laktamase (NDM-1) erwies sich Temocillin als besonders aktiv.

Die höchste antimikrobielle Empfindlichkeit gegenüber den drei Antibiotika zeigte sich bei Nitroxolin unabhängig von Spezies oder Resistenzmechanismen. Bei den CPE wurde für Nitroxolin sogar eine höhere Empfindlichkeit als für das Reserveantibiotikum Meropenem nachgewiesen.

Zusätzlich zu den durch das EUCAST empfohlenen Verfahren für die Empfindlichkeitstestung (Agardilution für Mecillinam, Mikrodilution für Temocillin und Nitroxolin) wurden Disk-Diffusionstests (Agardiffusion) durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Agardiffusion als ressourcenschonenderes Verfahren mit den Dilutionsverfahren gute Übereinstimmung für Mecillinam und

moderate Übereinstimmungen für Temocillin und Nitroxolin erzielen. Bezüglich der kategorialen Zuordnung, also „sensibel“ (S), „sensibel bei erhöhter Exposition bzw. Dosis“ (I) und „resistent“ (R) ergab sich für Mecillinam und Nitroxolin eine hundertprozentige Übereinstimmung. Bei Temocillin wurden lediglich 8 Isolate nicht in beiden verglichenen Testverfahren korrekt zugeordnet. Dies galt ausschließlich für *Morganella morganii* Isolate, für die bis dato keine EUCAST Breakpoints etabliert worden sind.

Zusammenfassend zeigt sich selbst in einem ausgewählten Kollektiv von multiresistenten Enterobakterien eine gute *in vitro* Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Substanzen Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin, wobei es Unterschiede zwischen den Substanzen, Spezies und Resistenzmechanismen gibt.

Insgesamt stützen die Daten trotz zunehmender Antibiotikaresistenz den kalkulierten Erstlinien-Einsatz der Substanzen bei HWI. Sie sind darüber hinaus ermutigend, dass sowohl bei Harnwegsinfektionen mit bekannt multiresistentem Erreger, als auch in anderen Indikationen weiterhin Therapieoptionen bestehen. Dafür sind jedoch weitere präklinische und klinische Studien erforderlich. Die Daten bestätigen außerdem den Einsatz von parenteral verabreichtem Temocillin bei anderen Infektionen verursacht durch ESBL-produzierende Enterobakterien.⁶

Zusätzlich liefert die Arbeit wichtige Anhaltspunkte zur Etablierung weiterer Grenzwerte für bestimmte Spezies durch das EUCAST.

Die Daten des Methodenvergleichs stützen die breitere Anwendung von Agardiffusionstests gegenüber den aufwändigeren Dilutionsverfahren.

3. Einleitung

3.1. Harnwegsinfektionen

Unter diesem Begriff werden verschiedene Infektionen des Harntrakts, also von Urethra (Harnröhre), Vesica urinaria (Harnblase), Ureteren (Harnleiter) und Pelvis renalis (Nierenbecken) zusammengefasst. Alle zeichnen sich durch laborchemische und/oder klinische Hinweise auf eine Reaktion des Körpers auf die Infektion aus. Symptome sind beispielsweise Dysurie (schmerzhaftes Wasserlassen) und/oder Pollakisurie (gehäuftes Wasserlassen).

Abzugrenzen von den Harnwegsinfektionen ist die asymptomatische Bakteriurie - der Nachweis von Bakterien im Urin ohne Vorliegen von Beschwerden. Dieser wird als Besiedelung des Harntraktes gewertet.¹

3.1.1. Einteilung der Harnwegsinfektionen

Eine wesentliche Einteilung erfolgt anhand des Vorliegens von Begleitfaktoren in „unkompliziert“ und „kompliziert“. Die unkomplizierte Harnwegsinfektion beschreibt gemäß der urologischen S3-Leitlinie „Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten“ die akute Infektion des Harntrakts in Abwesenheit von unten genannten Begleitfaktoren:¹

- Anomalien des Harntrakts (anatomisch und/oder funktionell, erworben und/oder angeboren)
- Vorliegen von Fremdkörpern
- (systemische) Begleiterkrankungen oder Therapien mit zunehmender Störung der Immunität

Alle übrigen Harnwegsinfektionen sind als kompliziert zu bezeichnen.

Üblicherweise wird ferner unterschieden die untere (Zystitis) und obere Harnwegsinfektion (Pyelonephritis), wobei letztere sich durch Vorliegen zusätzlicher Symptome wie Flanken- oder Nierenlagerklopfeschmerz und systemischen Reaktionen wie Fieber auszeichnet. Zusätzlich unterscheidet die Leitlinie Schweregrade bezüglich der Infektionen, insbesondere in Bezug auf obere Harnwegsinfektionen, ohne explizite Definition.¹

3.1.2. Erregerspektrum und Resistenzraten

Die häufigsten Erreger unkomplizierter Harnwegsinfektionen sind *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis*, wobei *E.coli* mit weitem Abstand am häufigsten nachgewiesen wird.¹

In Tabelle 1 sind gegenübergestellt die Häufigkeitsraten aus vier Studien zu Harnwegsinfektionen und Keimnachweisen in Urinproben zwischen 1999 und 2021.

In der ECO.SENS-Studie wurden Urinproben von 4734 Frauen mit ambulant erworbener, unkomplizierter Zystitis aus 17 Ländern von 1999 bis 2000 eingeschlossen.⁸ In 69% der Fälle konnten Uropathogene in signifikanter Keimzahl nachgewiesen werden.

In der ARESC-Studie wurden zwischen 2003 und 2006 4244 Urinproben von Frauen mit Symptomen einer unkomplizierten Zystitis in neun europäischen Ländern und Brasilien eingeschlossen.⁹ Hier wurde in 75% der Fälle ein Keim nachgewiesen. In Tabelle 1 sind die Daten nur für Deutschland (n = 317) ausgewiesen.

Die SARHA-Studie fokussiert sich auf ambulant erworbene Harnwegsinfektionen in allgemeinmedizinischen und internistischen Praxen in Deutschland. Hier wurden 1245 Teilnehmende zwischen 2015 und 2016 eingeschlossen, wobei in 70% der Fälle der Erregernachweis gelang. Im Falle eines Nachweis von *E.coli* wurde nach Kompliziertheit der Infektion stratifiziert, wobei je circa die Hälfte der Fälle kompliziert und unkompliziert zugeordnet wurde.¹⁰

Neuere Daten zur Verteilung von Uropathogenen gibt die Arbeit von Stoltidis-Claus et al.¹¹ Hier wurden zwischen 2016 und 2021 201.152 Urinproben von Männern und Frauen aus dem ambulanten und stationären Bereich im Westen Deutschlands gewonnen, jedoch ohne Angaben zur Symptomatik, so dass nicht zwischen asymptomatischer Bakteriurie und Infektion unterschieden werden kann.

Trotz leicht divergenter Kollektive zeigt sich, dass weiterhin *E. coli* die Uropathogene dominiert. Andere Enterobakterien nehmen an Häufigkeit zu, wohingegen *S. saprophyticus* tendenziell seltener nachgewiesen wird.

Tabelle 1 Typische Erreger von HWI bzw. Keimnachweise in Urinproben und deren Häufigkeiten

Studie	ECO.SENS ⁸	ARESC ⁹	SARHA ¹⁰	Stoltidis-Claus et al. ¹¹
Besonderheit/ Kriterien	Weibl. Pat., unkompl. Zystitis	Weibl. Pat., unkompl. Zystitis	Weibl. u. männl. Pat., HWI	Weibl. u. männl. Pat., Bakteriurie
Region	Europa u. Kanada, ambulant	Europa u. Brasilien, ambulant, hier: nur Deutschland	Deutschland, ambulant	Region West in Deutschland, stationär u. ambulant
Keime				
<i>E. coli</i>	77%	76,7%	74,5%	72,8%
<i>P. mirabilis</i>	6,3%	4,7%	3,9%	6,1%
<i>K. pneumoniae</i>	3,1%	2,5%	5,5%	9,7%
<i>Citrobacter</i> spp.	o. A.	0,6%	2,2%	2,4%
Nicht- Enterobakterien	9,6 %*	12,5%	o. A.	15,4%
<i>S. saprophyticus</i>	3,6%	3,5%	1,9%	0,6%

* Studie unterscheidet zwischen „andere Pathogene“ und „nicht-pathogene Erreger“. 9,6% bezieht sich auf „andere Pathogene“ zzgl. *S. saprophyticus*.

o. A.: ohne Angaben.

In der folgenden Tabelle 2 sind die Empfindlichkeits- bzw. Resistenzraten aus dem Jahr 2019 aus Deutschland, zu verschiedenen Enterobakterien für ausgewählte Antibiotika aufgeführt. Die Daten stammen aus dem Antibiotika-Resistenz Surveillance Programm des Robert-Koch-Instituts (RKI).¹² Anzumerken ist, dass die Daten alle eingesandten Proben beinhalten, einschließlich Isolaten aus Blutkulturen. Die Statistik differenziert somit nicht nach Keimen ausschließlich aus Urinproben, ebenso wenig, ob es sich um Entnahmen bei asymptomatischer Bakteriurie oder Harnwegsinfektionen handelt. Gemäß der Anmerkungen des RKI seien Screening-Einsendungen (bspw. Hautabstriche) möglichst ausgeschlossen worden. Es wurde für Tabelle 2 die Region „West“ ausgewählt, um die lokale Resistenzsituation im Bereich des IMMIH möglichst abzubilden. Analog zu den Daten der vorliegenden Studie wurden die Versorgungsbereiche „stationär“ und „ambulant“ zusammengefasst sowie alle Versorgungsstufen, Fachrichtungen und Stationsstypen einbezogen. Das Jahr 2019 wurde gewählt, da die Isolate der vorliegenden Studie zwischen März 2019 und Januar 2020 erfasst wurden. Es wurden die Daten zu den in unserer Studie

untersuchten Enterobakterien und den Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der III. Generation (3GC) und anderen klinisch häufig eingesetzten Antibiotika abgefragt.

Tabelle 2 Resistenzraten ausgewählter Bakterien und Antibiotika in Prozent

	FOS	TMP	MEC	CIP	CTX	CAZ	CRO	TZP	MEM
<i>E. coli</i>	1,1	2,6	9,0	17,3	10,2	9,5	9,7	5,6	0
<i>P. mirabilis</i>	15,0	40,9	40,7	17,1	1,4	1,3	1,4	0,6	0
<i>K. pneumoniae</i>	19,5	17,7	21,7	11,6	10,7	10,6	10,2	11,3	0,3
<i>K. oxytoca</i>	21,7	6,2	29,4	4,8	3,7	2,2	4,1	13,5	0,1
<i>M. morgani</i>	92,8	25,5	o. A.	13,1	16,7	15,5	15,8	4,4	0
<i>E. cloacae</i>	32,2	9,4	20,7	4,6	21,1	19,9	22,1	16,3	0,3
<i>C. freundii</i>	1,2	9,3	12,6*	5,3	18,7	18,3	20,5	13,5	0,2

(Datenquelle RKI, 2019, Deutschland)¹² *nur ambulante Werte. o. A.: ohne Angaben.

FOS, Fosfomycin; TMP, Trimethoprim; MEC, Mecillinam; CIP, Ciprofloxacin; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; CRO, Ceftriaxon; TZP, Piperacillin/Tazobactam; MEM, Meropenem.

Beim häufigsten Uropathogen *E. coli* lagen 2019 bereits Resistenzraten von 9 bis 17% gegen Mecillinam, Ciprofloxacin und 3GC vor. Beim ebenfalls häufigen *P. mirabilis* liegen die vier erstgenannten Antibiotika zwischen 15 bis 40%. Auch für *Klebsiella* spp., hier insbesondere *K. pneumoniae*, ist die Resistenzlage bei 3GC und oral applizierten Antibiotika ungünstig. Die intravenös verabreichten Reservesubstanzen Piperacillin/Tazobactam und Meropenem sind überwiegend noch sehr gut wirksam. Grundsätzlich liegen bei stationären Proben leicht höhere Resistenzraten vor, insbesondere bei *C. freundii* und *E. cloacae* gegenüber 3GC.

3.1.3. Therapie von unkomplizierten Harnwegsinfektionen

Die bereits genannte S3-Leitlinie zu unkomplizierten, bakteriellen und ambulant erworbenen HWI bei Erwachsenen von 2017 empfiehlt zur kalkulierten Therapie der unkomplizierten Zystitis bei Frauen gleichberechtigt die Gabe von Fosfomycin-Trometamol, Nitrofurantoin, Nitroxolin, Pivmecillinam und Trimethoprim (letzteres je nach örtlicher Resistenzlage).¹ Für die unkomplizierte Pyelonephritis werden Cephalosporine und Fluorchinolone (bevorzugt bei Männern) empfohlen.

Tabelle 3 Empfohlene Antibiotika bei unkomplizierter unterer Harnwegsinfektion

Fosfomycin-Trometamol
Nitrofurantoin
Nitroxolin
Pivmecillinam
Trimethoprim (bei lokaler Resistenzrate < 20 %)

(Datenquelle: S3-Leitlinie)¹

Noch 2014 wurden in der Indikation „Akute Zystitis“ ambulant in Deutschland überwiegend Fluorchinolone sowie Sulfonamide/Trimethoprim eingesetzt – ca. 70-90% der verordneten Antibiotika in der Indikation betreffen diese Substanzgruppen.¹³ Zwischen 2010 und 2018 wurden ambulant deutschlandweit, indikationsunabhängig, ca. 40% weniger Fluorchinolone und Sulfonamide/Trimethoprim eingesetzt sowie 17% weniger Cephalosporine. Nitrofurantoin, Fosfomycin und Nitroxolin wurden im gleichen Zeitraum häufiger eingesetzt und verzeichnen gemeinsam einen Anstieg von 175%.¹⁴ Pivmecillinam ist erst seit 2016 auf dem deutschen Markt erhältlich. Zwischen 2018 und 2021 hat sich die Verordnungszahl jedoch bereits verfünffacht.⁴

Zu Temocillin finden sich keine Daten zur Verordnungshäufigkeit, es ist jedoch erst seit 2019 in Deutschland zugelassen.

Somit besteht erfreulicherweise ein Trend hin zur Anwendung von Nitroxolin und Pivmecillinam und weg von potenziell nebenwirkungsreicheren Fluorchinolonen und Cephalosporinen. Es fehlen jedoch präklinische und klinische Daten zum Resistenzverhalten und der Wirksamkeit dieser Antibiotika. Gleiches gilt für Temocillin, das zwar ein anderes Indikationsspektrum (stationär behandelte, komplizierte und eher schwere Harnwegsinfektionen) aufweist, doch auch hier ist die Datenlage bisher dünn.

Genau diese Daten sind jedoch wichtig, um den weiteren Einsatz der Antibiotika zu rechtfertigen und hier setzt die vorliegende Arbeit an.

3.2. Enterobakterien

In den vorangehenden Kapiteln wurden bereits zahlreiche Bakterien aufgeführt, die den Enterobakterien zuzuordnen sind. Es handelt sich bei diesen um fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchenbakterien. Diese Mikroorganismen sind u.a. Teil der physiologischen Darmflora und können z.B. HWI oder Blutstrominfektionen verursachen. Wichtige Uropathogene sind u.a. *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. und *Proteus mirabilis*.¹⁵

3.2.1. Resistenzmechanismen

Mit dem Einsatz von Antibiotika und dem daraus resultierenden Selektionsdruck hat auch die Resistenzentwicklung der Erreger zugenommen. Unterschiedliche Mechanismen wie z.B. Modifikation von Penicillin-bindenden Proteinen, verstärkte Expression von Effluxpumpen, Einbau von Porinen oder Produktion von inaktivierenden Enzymen ermöglichen bestimmten Bakterien, sich den Effekten der Antibiotika zu entziehen.^{3,16}

Typisch für Enterobakterien ist dabei vor allem die Ausbildung von Enzymen, die in der Lage sind, Antibiotikabestandteile zu inaktivieren. Sind diese Enzyme gegen den β -Laktamring von β -Laktamantibiotika gerichtet, so spricht man von β -Laktamasen. Wichtige Vertreter sind die Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL) sowie die Ampicillinase C- β -Laktamase (AmpC), die in der Lage sind, Cephalosporine zu spalten.¹⁶

Zu den Carbapenemasen gehören u.a. *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase (KPC), New-Delhi-Metallo- β -Laktamase (NDM), Verona-Integron-Metallo- β -Laktamase (VIM) und Oxacillinasen (OXA-48-like). Mikroorganismen mit diesen Resistenzmechanismen sind besonders gefürchtet, da sie nicht nur die Reserveantibiotika wie Carbapeneme, sondern in der Regel alle gängigen β -Laktamantibiotika spalten können.^{15,17}

Klassifiziert werden β -Laktamasen z.B. nach Ambler, in vereinfachter Darstellung (siehe **Tabelle 4**).¹⁶⁻¹⁸

Tabelle 4 Einteilung der Carbapenemasen/ β -Laktamasen nach Ambler

Klasse A z.B. KPC, ESBL

Klasse B z.B. VIM, NDM

Klasse C z.B. AmpC

Klasse D z.B. OXA-48-like, ESBL

(vereinfacht)¹⁶⁻¹⁸

3.2.2. Resistenzraten ausgewählter Enterobakterien

Auf der folgenden Seite sind die Resistenzdaten von *E. coli* und *K. pneumoniae* Isolaten gegenüber 3GC und Carbapenemen im Vergleich europäischer Länder für 2019 dargestellt (siehe **Abbildung 1 - 4**). Die Grafiken entstammen dem Surveillance-Atlas vom European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net).¹⁹ Wie den Abbildungen zu entnehmen, ist die Häufigkeit der Resistenzen gegen 3GC europaweit relevant, insbesondere bei *K. pneumoniae* und mit Schwerpunkt in Süd- sowie Osteuropa. Bezüglich Carbapenemen liegen für *E. coli* europaweit kaum Resistenzen vor. Doch bei *K. pneumoniae* zeichnet sich, wieder mit Schwerpunkt in Südosteuropa, auch für Carbapeneme eine angespannte Situation mit Resistenzraten von bis zu 75% ab.

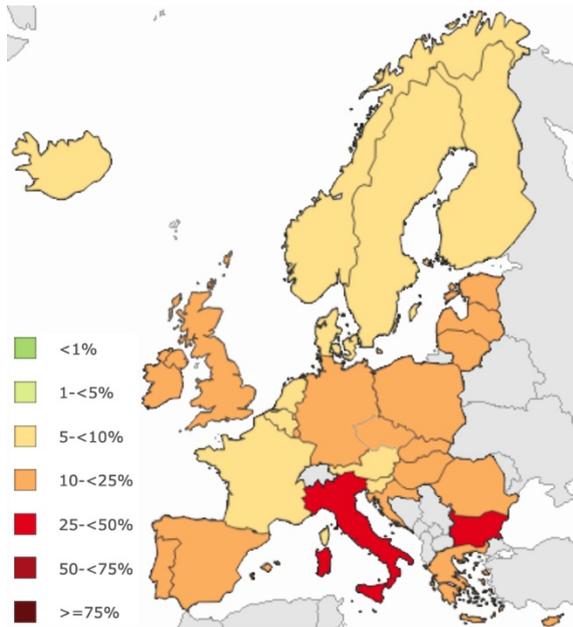


Abbildung 1 Resistenzraten *E. coli* bzgl. 3GC, 2019

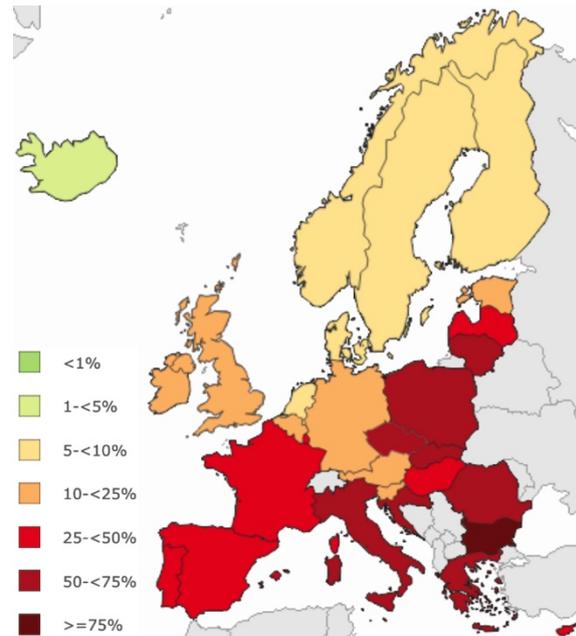


Abbildung 2 Resistenzraten *K. pneumoniae* bzgl. 3GC, 2019

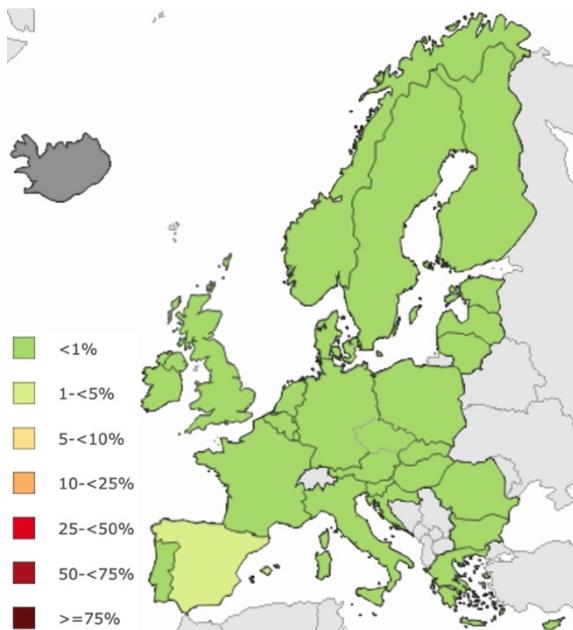


Abbildung 3 Resistenzraten *E. coli* bzgl. Carbapenemen, 2019

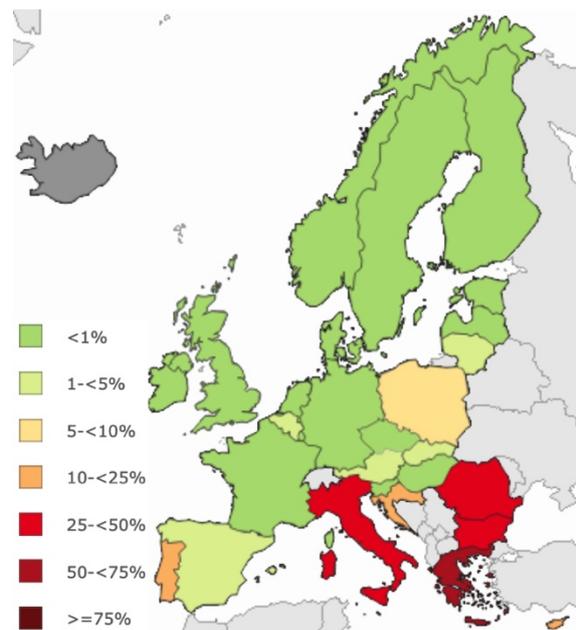


Abbildung 4 Resistenzraten *K. pneumoniae* bzgl. Carbapenemen, 2019

Bildnachweis: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). SURVEILLANCE REPORT. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2020. 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2020.pdf> (zuletzt abgerufen: 08.10.2023)

3.2.3. Einordnung der antimikrobiellen Empfindlichkeit von Bakterien

Für die Bewertung zur Wirksamkeit klinisch relevanter Antibiotika gibt es einheitliche Kriterien. Das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) gibt jährlich sogenannte Breakpoints (BPs) vor, die anhand der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eine Kategorisierung in sensibel oder resistent erlauben. Die MHK entspricht der niedrigsten Wirkstoffkonzentration, die ausreichend ist, um das bakterielle Wachstum innerhalb einer Bakterien-Agar-Suspension (Agardilution und -diffusion) oder im Flüssigmedium (Mikrodilution) zu verhindern. Die Empfindlichkeit eines Isolats auf ein Antibiotikum wird mit „sensibel“ (S), „sensibel bei erhöhter Exposition bzw. Dosis“ bzw. veraltet „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) bezeichnet.²⁰

3.3. Getestete Antibiotika

3.3.1. Mecillinam

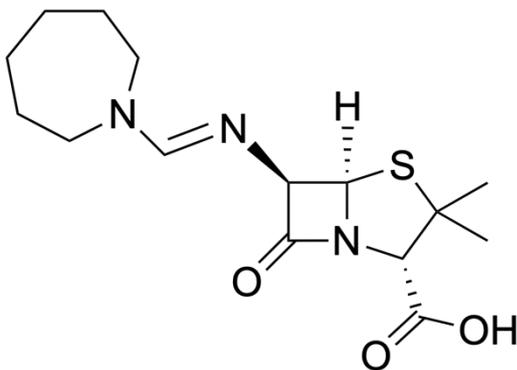


Abbildung 5 Strukturformel Mecillinam
nach Gelbe Liste²¹

Bei Mecillinam handelt es sich um ein 6-β-Amidinocillin. Dieses Penicillin-Derivat wurde bereits 1972 erstmals beschrieben.²² Pivmecillinam ist das oral applizierbare Prodrug. Es war in Deutschland bereits in den 80-90er Jahren zugelassen und ist wieder zugelassen seit 2016. Die Wirkung von Mecillinam beruht auf seiner selektiven Bindung an das Penicillin-bindende-Protein 2 (PBP2). Das PBP2 ist ein bakterielles Protein, welches an der Zellwandsynthese beteiligt ist. Durch die Bindung von Mecillinam kommt es zu einer Störung der Zellwandsynthese, welche letztendlich zum Zelluntergang führt.²¹ Das Wirkspektrum liegt im gram-negativen Bereich, weshalb Mecillinam für die Behandlung von unkomplizierten HWI empfohlen wird.¹

3.3.2. Temocillin

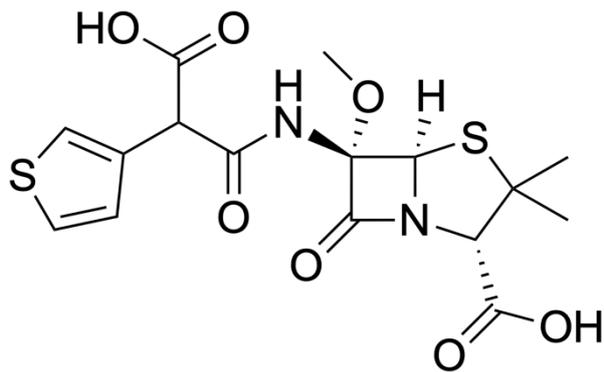


Abbildung 6 Strukturformel Temocillin
nach Gelbe Liste⁵

Bei Temocillin handelt es sich um ein altes 6- α -Methoxy-Derivat des β -Laktamantibiotikums Ticarcillin, das bereits 1981 in England entwickelt wurde und im langjährigen Einsatz in u.a. Skandinavien ist.^{23,24} In Deutschland ist es seit 2019 zugelassen, unter anderem in der Indikation komplizierter Harnwegsinfekt.⁶ Temocillin ist gegenüber β -Laktamasen wie ESBL und AmpC stabil und wird intravenös verabreicht.²⁵ Wie Mecillinam zeigt auch Temocillin eine hohe Affinität zum PBP2.²⁶ Es wird zunehmend als Carbapenem-sparendes Antibiotikum bei Harnwegsinfektionen eingesetzt, die durch multiresistente (MDR) Erreger verursacht werden.²⁴

3.3.3. Nitroxolin

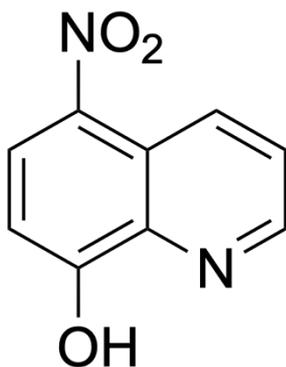


Abbildung 7 Strukturformel Nitroxolin
nach Gelbe Liste²⁷

Nitroxolin ist ein 8-Hydroxychinolin-Derivat und wirkt über Komplexbildung. Es ist in Deutschland zugelassen seit den 60er Jahren in der Indikation akute/chronische

HWI.²⁷ Es zeigt eine gute Wirkung gegenüber Enterobakterien einschließlich Carbapenemase-bildender Enterobakterien (CPE).²⁸ Darüber hinaus gibt es erste Daten zur Empfindlichkeit von Nicht-Enterobakterien und Pilzen.²⁹

EUCAST Breakpoints

Für die Antibiotika Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin wurden durch das EUCAST bisher nur BPs für wenige Spezies definiert. Die BPs von Juni 2023 sind für Mecillinam auf unkomplizierte Harnwegsinfektionen (HWI) und die Spezies *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp. *Enterobacter* spp. und *P. mirabilis* beschränkt.²⁰

Die BPs für Temocillin sind erst seit dem Update v11.0 (2021) verfügbar und gelten nur für Infektionen des Harntraktes, die durch *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. (außer *K. aerogenes*) oder *Proteus mirabilis* ausgelöst werden.³⁰

Für Nitroxolin wiederum gibt es lediglich BPs für *E. coli* bei unkomplizierten HWI.²⁰

Tabelle 5 Aktuelle EUCAST Breakpoints 2023

	Agardilution/Mikrodilution		Agardiffusion (Hemmhofdurchmesser)	
	S bzw. I	R	S bzw. I	R
Mecillinam	≤ 8 mg/L	> 8 mg/L	≥ 15 mm	< 15 mm
Temocillin	≤ 0,001 mg/L	> 16 mg/L	≥ 50 mm	< 17 mm
Nitroxolin	≤ 16 mg/L	> 16 mg/L	≥ 15 mm	< 15 mm

EUCAST Breakpoints v13.1²⁰

3.4. Testverfahren

Die Agardilution und Mikrodilution sind die bisher durch das EUCAST empfohlenen Methoden für ihre jeweilige Substanz. Die Agardiffusion ist ein seit den 50er Jahren bekanntes Verfahren, das weit verbreitet und einfach handzuhaben ist und sich in der mikrobiologischen Routinediagnostik bewährt und etabliert hat.^{31,32}

Für die drei folgenden Verfahren erfolgte zunächst das Auftauen der Kollektivisolate aus dem Archiv und die Anlage einer frischen Subkultur. Nach 24 Stunden wurden die bakteriellen Inokula durchmischt und mit einer Trübung entsprechend 0,5 nach McFarland-Standard densitometrisch eingestellt, um eine konstante Keimzahl für die anschließenden Testungen sicherzustellen.

Der *E. coli* American Type Culture Collection 25922 Stamm diente zur routinemäßigen Qualitätskontrolle und wurde bei jedem Testlauf mitgeführt.

3.4.1. Mikrodilution und Agardilution

Bei den Dilutionsverfahren handelt es sich um Reihenverdünnungen. Diese Techniken stellen für die meisten Antibiotika die empfohlene Methode zur Ermittlung der MHK für Bakterienstämme dar. Die ermittelte MHK wird in mg/L bzw. µg/mL angegeben.

Bei der Mikrodilution wird ein standardisiertes Inokulum des zu testenden Bakteriums mit aufsteigenden Antibiotikakonzentrationen im flüssigem Medium bei 37°C für 16-18 h inkubiert. Bleibt eine sichtbare Trübung aus, ist die MHK erreicht, weil das bakterielle Wachstum durch die Zugabe des Antibiotikums in der entsprechenden Konzentration gehemmt wird. Das erste Well ohne sichtbare Trübung entspricht also der MHK des Isolats. Bei Nutzung der 96-Well Platten mit Rundboden zeigt sich ein mögliches bakterielles Wachstum i.d.R. zentriert.³³ Die MHK-Bestimmungen von Temocillin und Nitroxolin wurden durch Mikrodilution mit Temocillin-Pulver (Eumedica, Basel, Schweiz) und Nitroxolin-Pulver (Rosen Pharma, St. Ingbert, Deutschland) durchgeführt. Temocillin wurde zur Testung in H₂O gelöst, Nitroxolin dagegen in Dimethylsulfoxid. Für Temocillin und Nitroxolin ist die Mikrodilution das durch EUCAST empfohlene Verfahren (siehe **Abbildung 8**).

Die Anwendung desselben Prinzips im festem Medium nennt sich Agardilution (siehe **Abbildung 9**). Hier wird eine definierte Konzentration des Antibiotikums vor dem Aushärten im Agar (Mueller-Hinton) eingestellt. Anschließend wird das bakterielle Inokulum auf dem Agar-Antibiotikum-Gemisch wie bei der Mikrodilution inkubiert. Die Dilutionsstufe, in der ein bakterielles Wachstum erstmals ausbleibt, entspricht der MHK. Für Mecillinam ist die Agardilution das empfohlene Referenzverfahren.³⁴ Hierfür werden je Dilutionsstufe Petrischalen mit bis zu 21 Teststämmen (inklusive Kontrollstamm) beimpft. Eine Ausnahme stellen die *P. mirabilis* Isolate dar. Aufgrund ihrer schleimbildenden Eigenschaften wurde diese Isolate jeweils in einer eigenen Petrischale getestet. Zur MHK-Bestimmung von Mecillinam wurde Mecillinam-Pulver (Molekula, München, Deutschland) genutzt, das zur Testung in H₂O gelöst wurde.

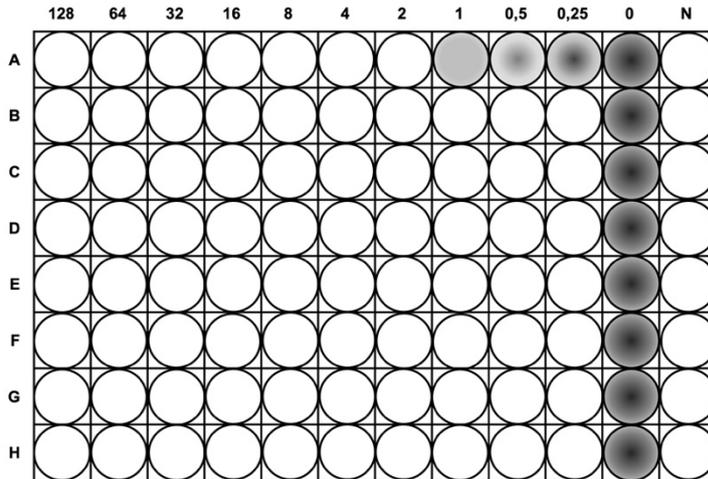


Abbildung 8 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte (Mikrodilution)

Dunkel: starkes bakterielles Wachstum. Hell: mäßiges Wachstum. Weiß: kein bakterielles Wachstum

Spalten: absteigende Dilutionsreihe, von 128mg/L bis 0,25 mg/L

Spalte 0: ohne Antibiotikum (0 mg/L)

Spalte N: Negativprobe ohne Bakterium

Zeilen A-G: Teststämme; exemplarisches Trübungsverhalten in A (hier: MHK entsprechend Dilutionsstufe 2mg/L)

Zeile H: Kontrollstamm

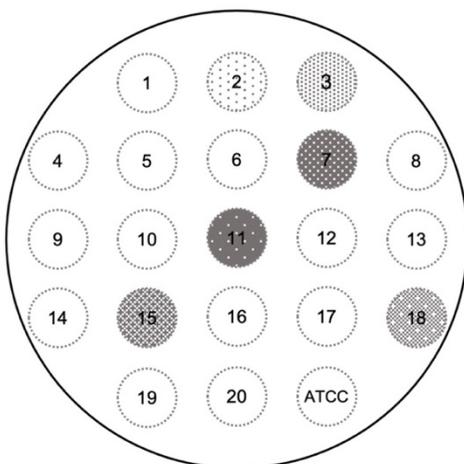


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Agardilution für Mecillinam

Kleine Kreise 1-20: Teststämme mittels Stempel aufgetragen auf Agar mit Mecillinam. Jede Verdünnungsstufe in eigener Petrischale

ATCC: Kontrollstamm

Exemplarisch kein (weiß), geringes (2), mäßig starkes (3, 15, 18), starkes (7, 11) Wachstum

3.4.2. Agardiffusion

In der Studie wurden ergänzend Disk-Diffusionstests für alle drei Antibiotika durchgeführt.

Dabei wird das Agarmedium mit der Bakteriensuspension mittels flächigem Tupferausstrich beimpft (siehe **Abbildung 10**). Anschließend werden innerhalb von 15 Minuten die Antibiotika-Plättchen (Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin) aufgelegt und mit der Platte bei $35^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$ für $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ inkubiert. Bei erfolgreichem und gleichmäßigem Anwachsen der Bakterienkulturen erfolgt das Ablesen des gebildeten Hemmhofdurchmessers (HHD) in Millimetern.³⁵ Ein großer Hemmhof entspricht einer hohen Empfindlichkeit des Teststamms gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum.

Die Testungen erfolgten mit $10 \mu\text{g}$ Mecillinam-Disks (Oxoid, Wesel, Deutschland), $30 \mu\text{g}$ Nitroxolin-Disks (Oxoid) und $30 \mu\text{g}$ Temocillin-Disks (Mast Group, Bootle, Großbritannien) sowie ESBL-Kombinationstests (Mast Group) und AmpC-Kombinationstests (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien). Alle Resistenztestungen erfolgten aus der gleichen Bakteriensuspension.

Bei der Agardiffusion werden Einzelkolonien innerhalb des Hemmhofs von Mecillinam und Temocillin nicht als bakterielles Wachstum gewertet.²⁰

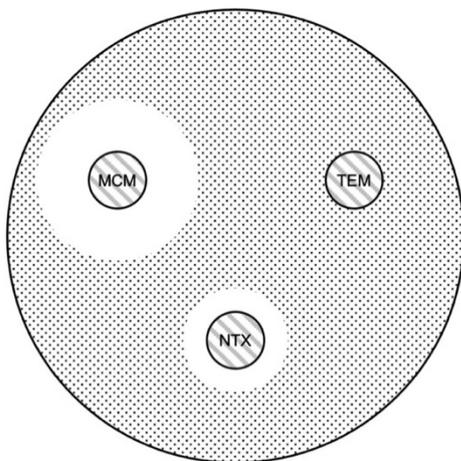


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Agardiffusion

Gepunktete Fläche: Bakterienwachstum im Agar in der Petrischale

Schraffiert: Antibiotika-Plättchen Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin

Weiß: Hemmhöfe; Temocillin exemplarisch ohne Hemmhof

3.4.3. Detektion von Resistenzen

Zusätzliche phänotypische Testungen

Zur Detektion von ESBL und AmpC wurden Kombinationstests nach Empfehlung durch das EUCAST durchgeführt.³⁶ Diese Tests beruhen auf dem Prinzip der Agardiffusion (siehe Kapitel 3.4.2).

ESBL-bildende Bakterien sind durch die Gabe der β -Laktaminhibitoren Clavulansäure und Sulbactam zu den Cephalosporinen Cefotaxim, Ceftazidim und Cefpodoxim hemmbar.¹⁶ So kann durch vergleichende Tests ESBL-Bildung demonstriert werden. Wenn das Bakterienwachstum trotz der Zugabe von β -Laktaminhibitoren stattfindet, kann als Resistenzmechanismus AmpC vorliegen.

Für die Detektion von AmpC gilt das Antibiotikum Cefoxitin als „Indikatorresistenz“.¹⁶ Wenn durch Zugabe von Cloxacillin zu Cefoxitin das Wachstum gehemmt wird, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine AmpC vor.³⁶

Genotypisierung

Zur Subtypisierung der Carbapenemasen wurden nach DNA-Isolierung PCR-Tests durchgeführt. Anschließend konnten durch die Sequenzierung von Genabschnitten Carbapenemase-Subtypen bestimmt werden.³⁷⁻³⁹ Diese Testungen erfolgten nicht im IMMIH Köln.

3.5. Auswahl des Studienkollektivs

Im Rahmen der Studie wurden Enterobakterien mit erhöhten MHK-Werten für 3GC (Cefotaxim und/oder Ceftazidim) und/oder Carbapeneme (Ertapenem, Imipenem oder Meropenem) eingeschlossen. Die Isolate wurden zwischen März 2019 und Januar 2020 im IMMIH Köln aus stationären und ambulanten Urinproben kultiviert.

Die Resistenztestung für die oben genannten Antibiotika erfolgte massenspektrometrisch durch das Vitek 2 System (bioMérieux) mit der AST N195 Karte. Die Ergebnisse wurden nach den EUCAST BPs interpretiert.

Im Fall von erhöhten Carbapenem-MHK wurden die Isolate zusätzlich durch PCR-Testungen, gefolgt von externen Sanger- oder Ganzgenomsequenzierung, untersucht. Ebenfalls wurde überprüft, ob aus Urin nachgewiesene Isolate bei gleichem/r Patienten/in auch in den zugehörigen Blutkulturen nachgewiesen werden konnten.

3.6. Statistische Auswertung

Die MHK50 bzw. MHK90 sind diejenigen MHK-Werte, die ein Wachstum von 50 bzw. 90% der bakteriellen Teststämme hemmen (Berechnung MHK50/90 als 50. und 90. Perzentile).

Zum Methodenvergleich wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman herangezogen. Zur Berechnung wurde SPSS Version Statistics 27 (IBM, NY, USA) genutzt. Die Durchführung eines zweiseitigen T-Tests diente als Signifikanztest (Vergleich der Methoden).

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA) Version 16.65.

3.7. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll Auskunft geben über:

1. Die *in vitro* Empfindlichkeit von multiresistenten, uropathogenen Enterobakterien gegenüber den Antibiotika Mecillinam Nitroxolin und Temocillin – bei bisher ungenügender Datenlage und Breakpoints insbesondere im Bereich von MDR-Enterobakterien neben *E. coli* Isolaten
2. Vergleich der Agardiffusion als praktikableres Testverfahren gegenüber den durch das EUCAST empfohlenen Methoden, im Kontext multiresistenter uropathogener Enterobakterien

4. Publikation

***In vitro* activity of mecillinam, temocillin and nitroxoline against MDR Enterobacterales**

In vitro activity of mecillinam, temocillin and nitroxoline against MDR Enterobacterales

Lars Plambeck [†], Frieder Fuchs [†], Janko Sattler ¹ and Axel Hamprecht ^{1,2,3*}

¹Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Medical faculty and University Hospital of Cologne, Cologne, Germany; ²German Centre for Infection Research, partner site Bonn-Cologne (DZIF), Cologne, Germany; ³Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

*Corresponding author. E-mail: axel.hamprecht@uol.de

†These authors share first authorship.

 @a_hamprecht

Received 20 April 2022; accepted 9 May 2022

Background: With increasing resistance to common antibiotics the treatment of urinary tract infections has become challenging and alternative therapeutic options are needed. In the present study, we evaluate the activity of three older and less frequently used antibiotics against MDR Enterobacterales.

Methods: Susceptibility of mecillinam, temocillin and nitroxoline was assessed in Enterobacterales isolated from urinary specimens with elevated MICs of third-generation cephalosporins. Susceptibility was determined by the recommended reference MIC methods and additionally by disc diffusion. All isolates were characterized for common β -lactamases by phenotypic and molecular assays.

Results: In total 394 Enterobacterales were included. The most common resistance mechanisms were ESBLs ($n=273$), AmpC ($n=132$), carbapenemases [$n=12$, including OXA-48-like ($n=8$), VIM ($n=2$), KPC ($n=1$) and NDM ($n=1$)] or others ($n=2$). Resistance was observed in 59% of isolates to ceftazidime, in 41% to piperacillin/tazobactam and in 54% to ciprofloxacin. In comparison, resistance was less frequent against mecillinam (15%), temocillin (13%) or nitroxoline (2%). Mecillinam showed higher activity in *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* and in OXA-48-like-producing isolates compared with temocillin, which was more active in *Proteus mirabilis* and in ESBL-producing isolates. Activity of nitroxoline was high against all isolates, including carbapenemase-producing isolates. Correlation between disc diffusion and MIC methods was good for mecillinam and moderate for temocillin and nitroxoline.

Conclusions: Mecillinam, temocillin and nitroxoline show good to excellent *in vitro* activity in MDR Enterobacterales. The activity of mecillinam and temocillin was higher in certain species and restricted depending on β -lactamase production while nitroxoline showed universally high activity irrespective of species or β -lactamase present.

Introduction

With increasing antibiotic resistance the therapy of urinary tract infections (UTI) has become more and more difficult and the need for alternative therapies has led to regained interest in older drugs such as mecillinam, temocillin and nitroxoline.^{1–3} Gram-negative bacteria resistant to carbapenems or third-generation cephalosporins are particularly concerning.⁴ Facing the paucity in the development of new antibiotics, the revival of older antibiotics has become an important strategy to fight the antimicrobial resistance (AMR) crisis.⁵

Mecillinam, temocillin and nitroxoline were developed in the 1950s–80s.^{6–8} The current use of these drugs is mostly limited

to infections of the urinary tract. Pivmecillinam, the oral prodrug of mecillinam, has been used in Scandinavian countries for the treatment of uncomplicated UTI (uUTI) for decades. Both pivmecillinam and nitroxoline are recommended as oral agents in the guideline on uUTI in Germany.⁹ In contrast parenteral temocillin is also used for invasive infections, yet experience is limited to some European countries, especially UK, France and Belgium.¹⁰ All three agents may remain active against MDR pathogens and side effects are rare.^{2,11–16}

Mecillinam and temocillin are both β -lactam antibiotics.^{2,3} Nitroxoline is a quinoline derivate and the mode of action is based on ion chelation with subsequent effects on microbial enzymatic pathways (including transcription factors) and effects on the

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of British Society for Antimicrobial Chemotherapy.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1 of 7

charge of cellular compartments.² Mecillinam, temocillin and nitroxoline differ in the route of administration: For mecillinam oral and IV administration is possible; in contrast temocillin can only be applied IV while nitroxoline is available only in oral form.

With the increasing number of infections by MDR strains there is regained interest in these older antibiotics.¹⁷ Hence, over the past 12 years, EUCAST has issued breakpoints for all three drugs, which are currently limited to certain species. Additionally, breakpoints for mecillinam and nitroxoline apply only to uUTI while for temocillin breakpoints are also valid for complicated UTI (cUTI).¹⁸ To date, only limited data on susceptibility testing of these drugs and correlation of testing methods are available, as reference methodologies are laborious (i.e. agar dilution for mecillinam) and not available in most clinical microbiology laboratories.

Currently only few studies on the susceptibility of mecillinam, temocillin and nitroxoline have been performed and to the best of our knowledge none has compared the activity of all three substances in MDR Enterobacterales isolates.

The aim of the present study was therefore to determine the activity of all three drugs in a collection of different MDR uropathogenic Enterobacterales. Secondly, we assessed disc diffusion testing as an alternative method for susceptibility testing of the three drugs and compared it with current reference methods.

Materials and methods

Enterobacterales with elevated MICs of cefotaxime and/or ceftazidime and/or ertapenem, imipenem or meropenem that had been isolated from urine specimens at the Institute for medical Microbiology of the University Hospital Cologne between March 2019 and January 2020 were included in the study. Susceptibility testing of standard antibiotics was done on a Vitek 2 system using the AST N195 card (bioMérieux, Nürtingen, Germany) and results were interpreted according to EUCAST breakpoints. Isolates were further characterized for ESBL production by the CLSI combination disc test (MAST-group, Bootle, UK) and for AmpC using the cefoxitin/cloxacillin and cefotaxime/cloxacillin disc test (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy), as described previously.^{19,20} In case of elevated carbapenem MICs isolates were characterized by a rapid PCR assay (GeneXpert, Carba-R kit, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), followed by PCR and Sanger sequencing or WGS as described previously.^{21–23} MICs of mecillinam were assessed by agar dilution using mecillinam powder (Molekula, Munich, Germany). MICs of temocillin and nitroxoline were determined by broth microdilution using temocillin powder (Eumedica, Basel, Switzerland) and nitroxoline powder (Rosen Pharma, St. Ingbert, Germany) in 96-well plates. For the three drugs breakpoints defined by EUCAST for selected species were used for all Enterobacterales species to allow comparison of susceptibility rates.

Additionally, susceptibility testing by disc diffusion was performed using 10 µg mecillinam discs (Oxoid, Wesel, Germany), 30 µg nitroxoline discs (Oxoid) and 30 µg temocillin discs (MAST). All susceptibility tests were performed from the same bacterial suspension. *Escherichia coli* ATCC 25922 served as quality control. Spearman's correlation coefficient for ranked data served to assess correlation of MICs and inhibition zones.

Ethics

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All bacterial strains were isolated as part of routine microbiological diagnostics. The requirement for written informed consent was waived due to the observational, retrospective nature of this study.

Results

In total 394 Enterobacterales (Table 1 and Table S1, available as Supplementary data at JAC-AMR Online) were included in the study. *E. coli* was the most common species ($n=198$), followed by *Klebsiella pneumoniae* ($n=66$), *Enterobacter* spp. ($n=52$) and other species ($n=78$) (Figure S1). The most frequent isolation source was voided midstream urine (245 isolates), catheter urine ($n=98$) and other sources ($n=51$). Most patients were female (214/394, 54%), the median age was 66 years. The majority of isolates was cultured from samples of inpatients (258/394, 65%) and from the urological department (137/394, 35%). For 20 of 394 isolates (5%) a coincident bloodstream infection with the same species and resistance phenotype was detected.

Of all isolates, 273 (69%) tested positive for ESBL production and 132 (34%) showed the phenotype of a derepressed AmpC β -lactamase. One *Klebsiella oxytoca* isolate (0.3%) hyperproduced the chromosomal K1 β -lactamase. Carbapenemases were detected in 12 isolates (3%), including OXA-48-like ($n=8$), VIM ($n=2$), KPC ($n=1$) and NDM ($n=1$) (Table 2 and Table S1).

Overall, meropenem [MIC_{50/90} <0.25/<0.25 mg/L, 2% resistant (R)] and nitroxoline (MIC_{50/90} 4/16 mg/L, 2% R) were the most active antibiotics *in vitro*, followed by mecillinam (MIC_{50/90} 2/128 mg/L, 15% R), temocillin (MIC_{50/90} 4/32 mg/L, 13% R) and cefepime (MIC_{50/90} 2/64 mg/L, 24% R) (Figure 1 and Table S1). MIC_{50/90} for other antibiotic agents was >64/>64 mg/L for cefotaxime (92% R), 16/>64 mg/L for ceftazidime (59% R), 8/>128 mg/L for piperacillin/tazobactam (41% R) and <0.5/1 mg/L for ertapenem (11% R).

In ESBL-positive isolates MIC_{50/90} was 4/32 mg/L (12% R) for mecillinam, 4/16 mg/L (7% R) for temocillin and 4/8 mg/L (1% R) for nitroxoline compared with 2/>128 mg/L (19% R) for mecillinam, 8/64 mg/L (27% R) for temocillin and 4/16 mg/L (2% R) for nitroxoline in AmpC isolates (Table 2). In carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) MICs of mecillinam and temocillin were higher (MIC_{50/90} 64/>128 mg/L for mecillinam, 67% R; MIC_{50/90} 128/>128 mg/L for temocillin, 75% R), while MICs of nitroxoline were similar to ESBL/AmpC-producing isolates (MIC_{50/90} 4/8 mg/L, 0% R) (Table 2).

Mecillinam

Mecillinam showed excellent *in vitro* activity in *E. coli*, *Klebsiella aerogenes* and *Enterobacter* spp., despite ESBL and/or AmpC overexpression (Table S1). In CPE, susceptibility was limited to isolates with OXA-48-like carbapenemases and low carbapenem MICs (4/8, 50%) (Table S2).

Of note, among *Klebsiella* spp., 10/12 *K. aerogenes* isolates (83%) were susceptible to mecillinam compared with 50/66 *K. pneumoniae* isolates (76%) and 0/9 *K. oxytoca* isolates (0%).

Particularly poor activity was demonstrated for MDR *Proteus mirabilis* (MIC_{50/90} >128/>128 mg/L, 5/8 isolates R).

All three isolates of *Hafnia alvei* showed low mecillinam MICs (0.5–4 mg/L) despite derepressed AmpC, but so far no EUCAST breakpoint has been defined for this species.

Temocillin

Stratified by species, temocillin was most active in *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* (Table 1). In ESBL-producing isolates temocillin was more active (20/273, 7% R) compared with

Table 1. MICs of isolates of mecillinam, temocillin and nitroxoline, stratified by species

Species (n)	Mecillinam (S ≤ 8/R > 8 mg/L ^a)			Temocillin (S ≤ 0.001/R > 16 mg/L ^a)			Nitroxoline (S ≤ 16/R > 16 mg/L ^a)		
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)
<i>E. coli</i> (198)	2	0.25 to 64	6 (3)	4	0.5 to >128	8 (4)	2	0.25 to 32	2 (1)
<i>Klebsiella</i> spp. (87)	8	0.5 to >128	27 (31)	4	0.5 to >128	13 (15)	4	1 to 64	2 (2)
<i>K. pneumoniae</i> (66)	4	0.5 to >128	16 (24)	4	0.5 to >128	8 (12)	4	1 to 64	2 (3)
<i>K. aerogenes</i> (12)	2	1 to >128	2 (17)	8	2 to 128	4 (33)	4	1 to 8	0
<i>K. oxytoca</i> (9)	64	32 to >128	9 (100)	4	1 to 32	1 (11)	4	1 to 8	0
<i>Enterobacter</i> spp. (52)	1	0.125 to >128	2 (4)	8	0.5 to 128	16 (31)	8	0.5 to 64	2 (4)
<i>C. freundii</i> (33)	2	0.125 to >128	9 (27)	8	0.25 to >128	11 (33)	4	0.5 to 16	0
<i>Citrobacter koseri</i> (1)		8	0		2	0		4	0
<i>M. morgani</i> (11)	>128	128 to >128	11 (100)	16	4 to 64	4 (36)	4	0.5 to 16	0
<i>P. mirabilis</i> (8)	>128	2 to >128	5 (63)	2	1 to 4	0	4	1 to 8	0
<i>H. alvei</i> (3)	2	0.5 to 4	0	8	4 to 8	0	2	2	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)		2	0		8	0		8	0
All isolates (394)	2	0.125 to >128	60 (15)	4	0.25 to >128	52 (13)	4	0.25 to 64	6 (2)

S, susceptible; R, resistant.

^aBreakpoint according to EUCAST for selected species.**Table 2.** MICs of isolates, stratified by β-lactamases

β-Lactamase (n)	Mecillinam (S ≤ 8/R > 8 mg/L ^a)			Temocillin (S ≤ 0.001/R > 16 mg/L ^a)			Nitroxoline (S ≤ 16/R > 16 mg/L ^a)		
	MIC _{50/90} (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)	MIC _{50/90} (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)	MIC _{50/90} (mg/L)	MIC range (mg/L)	Resistant isolates, n (%)
ESBL (273)	4/32	0.25 to >128	34 (12)	4/16	0.5 to >128	20 (7)	4/8	0.25 to 64	4 (1)
AmpC (132)	2/>128	0.125 to >128	25 (19)	8/64	0.25 to >128	36 (27)	4/16	0.5 to 64	2 (2)
ESBL + AmpC (16)	8/>128	1 to >128	4 (25)	4/64	1 to 64	5 (31)	8/16	2 to 16	0
HyperK1 (1)	>128		1 (100)	8		0	4		0
Carbapenemases (12)	64/>128	1 to >128	8 (67)	128/>128	2 to >128	9 (75)	4/8	0.5 to 8	0
KPC (1)	>128		1 (100)	4		0	0.5		0
OXA-48-like (8)	8/64	1 to 128	4 (50)	128/>128	64 to >128	8 (100)	2/8	1 to 8	0
MBL (3) (VIM, NDM)	>128/ >128	>128	3 (100)	4/>128	2 to >128	1 (33)	4/8	4 to 8	0

S, susceptible; R, resistant.

^aBreakpoint according to EUCAST for selected species.

mecillinam (34/273, 12% R), but less active compared with nitroxoline (4/273, 1% R).

As expected, no relevant activity was found in OXA-48-like producers while a KPC-expressing *Citrobacter freundii* and 2/3 MBL-producing isolates (VIM-1 and NDM-1, both *P. mirabilis*) were susceptible to temocillin (Table S2).

Nitroxoline

Overall, nitroxoline demonstrated the highest *in vitro* activity in our challenge collection. In *E. coli* 99% (196/198) of isolates were nitroxoline susceptible. High nitroxoline MICs >16 mg/L were rare (*n*=6) and were recorded in four ESBL-producing isolates [*E. coli*

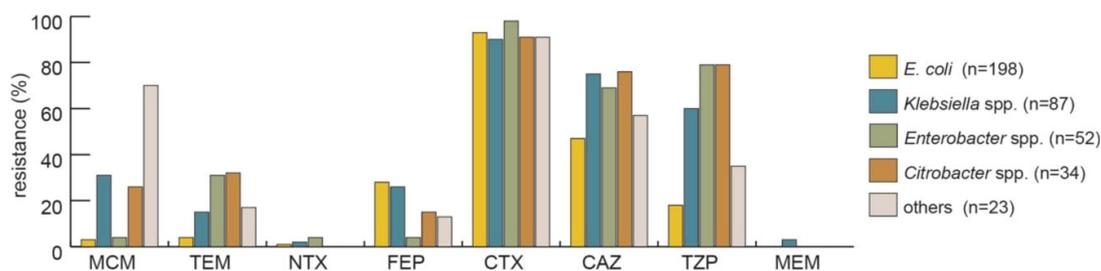


Figure 1. Resistance to common antibiotics in the challenge collection. MCM, mecillinam; TEM, temocillin; NTX, nitroxoline; FEP, cefepime; CTX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; TZP, piperacillin/tazobactam; MEM, meropenem.

($n=2$), *K. pneumoniae* ($n=2$)] and two isolates with overexpressed AmpC [*E. cloacae* ($n=2$)]. The activity of nitroxoline was high irrespective of species and β -lactamase: MIC_{50/90} was 4/8 mg/L for isolates producing ESBLs, 4/16 mg/L for AmpC, 4/8 mg/L for CPE and 4/16 mg/L for isolates producing other β -lactamases.

Comparison of methods for susceptibility testing

The correlation of dilution methods and disc diffusion results over all species was excellent for mecillinam and moderate for temocillin and nitroxoline [Spearman's correlation coefficient $r=-0.837$ for mecillinam, $r=-0.474$ for temocillin and $r=-0.352$ for nitroxoline ($P<0.01$)] (Figure 2a–c and Figure S2a–c). For temocillin all errors concerned *Morganella morganii*, for which no EUCAST breakpoints have been defined.

Discussion

This study compares the activities of three drugs in a collection of 394 MDR Enterobacterales isolates with different resistance mechanisms.

Compared with most other antibiotics, e.g. ceftazidime (59% R), piperacillin/tazobactam (41% R) or ciprofloxacin (54% R), the activity of mecillinam (15% R), temocillin (13% R) and nitroxoline (2% R) in this collection of MDR isolates was high.

Mecillinam was highly active against *E. coli*, *K. aerogenes* and *Enterobacter* spp. with ESBL production and/or AmpC overexpression, similar to results of previous studies.¹⁴ Susceptibility among CPE was limited to isolates with OXA-48-like carbapenemases with low carbapenem MICs, as previously shown.¹⁵ Some authors have suggested the use of mecillinam in cUTI or even bloodstream infections.^{24,25} However, only limited data on (piv)mecillinam serum and urinary levels are available.^{26,27} Higher maximum serum (peak 12 mg/L after 200 mg IV) and urinary concentrations have been shown after parenteral administration.²⁸ Given the low mecillinam MICs recorded in the present study (198/394 isolates MIC ≤ 2 mg/L) the use of parenteral mecillinam could be a carbapenem-sparing alternative for infections with MDR Enterobacterales and should be further studied.

The activity of temocillin was high in *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* and in ESBL-producing isolates. In CPE, susceptibility was retained in isolates producing KPC, VIM-1 and NDM-1, but not in OXA-48-like producers as previously shown.²⁹

However, these results have to be interpreted with caution as the number of CPE isolates in this study was low.

With the ongoing discussion on breakpoints and dosing it should be emphasized that the EUCAST temocillin breakpoints apply to high exposure (2 g q8h) for wild-type populations (MIC 1–16 mg/L).

Measured serum/urine concentrations for the above mentioned dosage scheme (peak 236 mg/L in serum and 68% in urine within 24 h) exceed MICs assessed in our study.^{3,30}

In the present study Enterobacterales species without breakpoints (e.g. *E. cloacae* and *C. freundii*) were included and showed similar MICs compared with *E. coli* or *K. pneumoniae* (MIC_{50/90} 8/32 mg/L; 8/128 mg/L). Clinical success of temocillin treatment has been documented for infections caused by ESBL-producing isolates as well as Enterobacterales with derepressed AmpC.^{10,31} However, in line with other studies, in our cohort MICs were higher in presence of AmpC overexpression (MIC_{50/90} of 8/64 mg/L versus MIC_{50/90} of 4/16 mg/L in absence of AmpC).^{31,32}

Overall our data demonstrate that temocillin has high activity in MDR Enterobacterales and may be used as an alternative drug to spare common broad spectrum antibiotics such as piperacillin/tazobactam or carbapenems.³² Temocillin could serve as a step-down therapy after susceptibility testing. However, more prospective data on the outcome of MDR infections treated with temocillin is needed, especially for those originating from non-urinary foci.

The highest susceptibility of Enterobacterales was observed for nitroxoline. Of particular interest, nitroxoline shows excellent activity in presence of carbapenemases and was more active in CPE than meropenem, as previously demonstrated.¹²

Data on serum and urine concentrations of nitroxoline are highly diverging (conjugated form: serum peak 5–9.5 mg/L; unconjugated form: serum peak 0.5–400 mg/L; conjugated form: urine peak 27–210 mg/L) and the role of the conjugated form is still unclear.^{33,34}

However, serum and urine concentration levels of the unconjugated form exceed the MICs for most isolates of our collection, making nitroxoline a promising candidate for eradication of otherwise drug-resistant Enterobacterales in uUTI.

On the other hand, therapeutic failure has been reported for patients with UTI caused by *E. coli*.³⁵ Thus, despite promising *in vitro* data more *in vivo* data are needed, especially on the correlation of microbiological success and clinical outcome of UTI treated with nitroxoline.

As MIC determination by agar dilution and broth microdilution is laborious and only few commercial assays for MIC determination

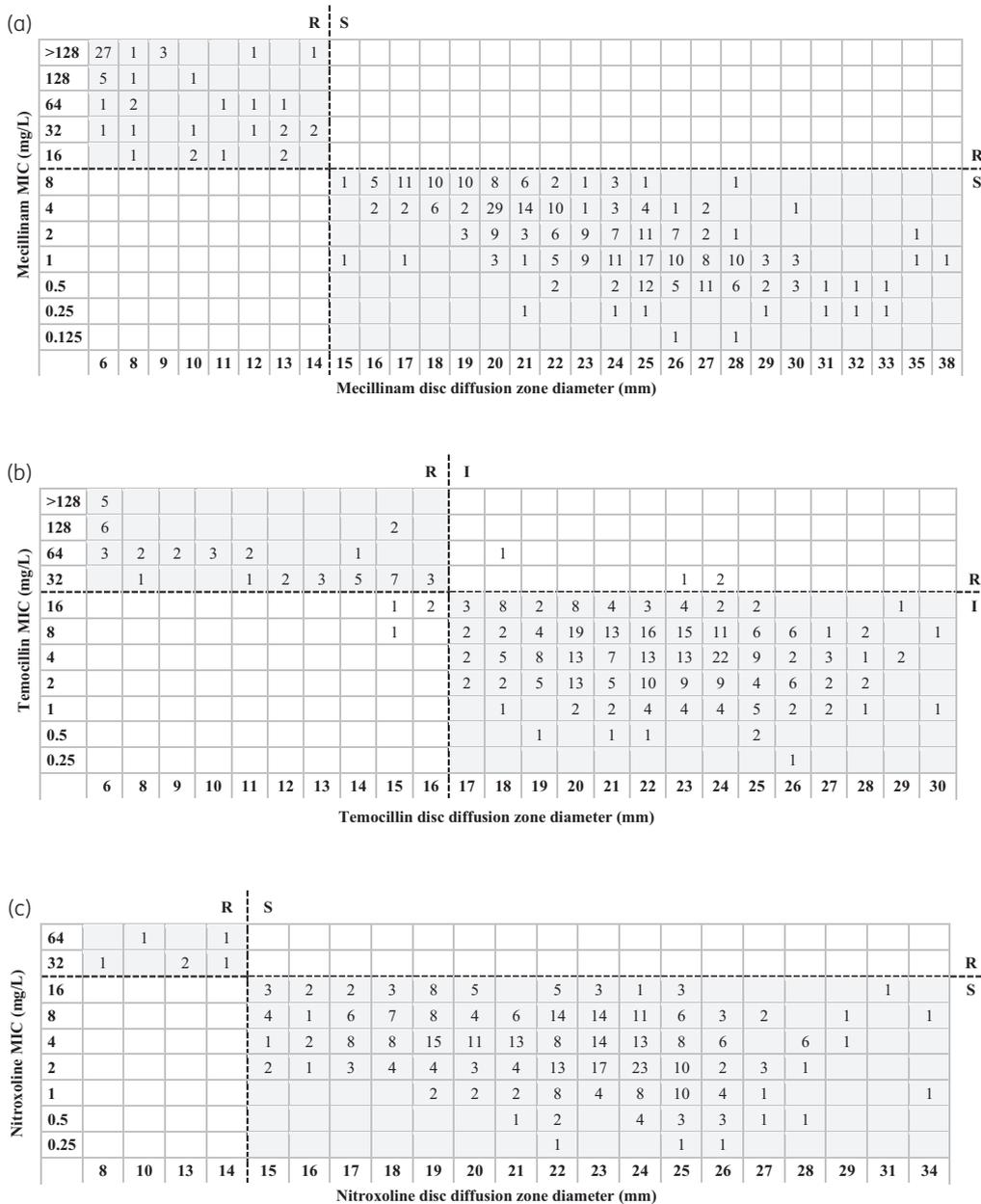


Figure 2. Comparison of MIC testing and disc diffusion for all isolates (n=394). Dashed lines indicate EUCAST 12.0 breakpoints. S, susceptible at standard exposure; I, susceptible increased exposure; R, resistant. (a) Comparison of mecillinam agar dilution and disc diffusion. (b) Comparison of temocillin broth dilution and disc diffusion. (c) Comparison of nitroxoline broth dilution and disc diffusion.

are available, an alternative testing method is needed that can be carried out in clinical microbiology laboratories. Therefore, disc diffusion was assessed and results were compared with those from reference methods. Disc diffusion testing correlated

excellently with MIC determination for mecillinam ($r = -0.837$), while for temocillin ($r = -0.474$) and nitroxoline ($r = -0.352$) the correlation was lower. It has to be taken into account that the number of resistant isolates was low for all three drugs, which limits the assessment of the correlation between MIC and inhibition zones.

No major or very major errors were recorded for mecillinam disc testing, which have previously been described for CPE isolates. This indicates that overestimation of mecillinam susceptibility in MDR Enterobacterales might be limited to some CPE, but does not apply to isolates with other resistance mechanisms.¹⁵

Overall, in this cohort of MDR Enterobacterales, therapeutical options are limited and mecillinam, temocillin and nitroxoline are valuable assets for UTI treatment. Isolates resistant to nitroxoline were very rare, despite expression of ESBL, AmpC overexpression or even carbapenemases. Our data further demonstrate that mecillinam and temocillin are often hydrolysed to a lesser extent than other β -lactams.³⁶ In MDR Enterobacterales mecillinam may be particularly promising for ESBL-, AmpC- or OXA-48-like-producing *E. coli* and *Enterobacter* spp., while temocillin is particularly active in ESBL-expressing isolates.

Our study has some limitations. Most samples were from inpatients and therefore might not be completely representative for uUTI. The strength of our study is that it includes many MDR isolates compared with previous studies, and additionally assessed species other than *E. coli* including those without currently defined breakpoints. Additionally, we provide data on the performance of disc diffusion compared with MIC determination. This will likely be helpful for the determination of susceptibility in MDR isolates in routine laboratories that cannot perform susceptibility testing with laborious reference methods.

With the problem of continuously increasing AMR, all three drugs should be further investigated with *in vivo* studies either as definite therapy or as part of a combination therapy for MDR Enterobacterales.

Funding

This work was supported by the German Center for Infection Research (DZIF, to A.H.).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 and Figures S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC-AMR Online.

References

- Pinart M, Kranz J, Jensen K et al. Optimal dosage and duration of pivmecillinam treatment for uncomplicated lower urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2017; **58**: 96–109.
- El Sakka N, Gould IM. Role of old antimicrobial agents in the management of urinary tract infection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016; **9**: 1047–56.
- Alexandre K, Fantin B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of temocillin. *Clin Pharmacokinet* 2018; **57**: 287–96.
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 371–9.
- Cassir N, Rolain JM, Brouqui P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front Microbiol* 2014; **5**: 551.
- Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH et al. BRL 17421, a novel β -lactam antibiotic, highly resistant to β -lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**: 38–46.
- Petrow V, Sturgeon B. Some quinoline-5 : 8-quinones. *J Chem Soc* 1954: 570–4.
- Lund F, Tybring L. 6 -amidinopenicillanic acids- -a new group of antibiotics. *Nat New Biol* 1972; **236**: 135–7.
- Kranz J, Schmidt S, Lebert C et al. The 2017 update of the German clinical guideline on epidemiology, diagnostics, therapy, prevention, and management of uncomplicated urinary tract infections in adult patients: part 1. *Urol Int* 2018; **100**: 263–70.
- Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2628–31.
- Zykov IN, Sundsfjord A, Smabrekke L et al. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomicin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Norway 2010–2011. *Infect Dis (Lond)* 2016; **48**: 99–107.
- Fuchs F, Hamprecht A. Susceptibility of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) to nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 2934–7.
- Fuchs F, Hof H, Hofmann S et al. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2021; **27**: 1697.e7–e10.
- Fuchs F, Hamprecht A. Results from a prospective *in vitro* study on the mecillinam (amdinocillin) susceptibility of Enterobacterales. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: 2402–18.
- Fuchs F, Ahmadzada A, Plambeck L et al. Susceptibility of clinical Enterobacterales isolates with common and rare carbapenemases to mecillinam. *Front Microbiol* 2020; **11**: 627267.
- Naber KG, Niggemann H, 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.
- Theuretzbacher U, Van Bambeke F, Canton R et al. Reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2177–81.
- EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 12.0. 2022. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M et al. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2957–63.
- Rohde AM, Zweigner J, Wiese-Posselt M et al. Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales colonization on hospital admission and ESBL genotype-specific risk factors: a cross-sectional study in six German university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 1631–8.
- Hamprecht A, Vehreschild JJ, Seifert H et al. Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 2018; **13**: e0204157.
- Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**: 1286.e9–e15.

- 23** Hamprecht A, Sommer J, Willmann M *et al.* Pathogenicity of clinical OXA-48 isolates and impact of the OXA-48 IncL plasmid on virulence and bacterial fitness. *Front Microbiol* 2019; **10**: 2509.
- 24** Boel JB, Antsupova V, Knudsen JD *et al.* Intravenous mecillinam compared with other β -lactams as targeted treatment for *Escherichia coli* or *Klebsiella* spp. bacteraemia with urinary tract focus. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 206–11.
- 25** Jansaker F, Frimodt-Moller N, Benfield TL *et al.* Mecillinam for the treatment of acute pyelonephritis and bacteremia caused by Enterobacteriaceae: a literature review. *Infect Drug Resist* 2018; **11**: 761–71.
- 26** Kern MB, Frimodt-Moller N, Espersen F. Urinary concentrations and urine ex-vivo effect of mecillinam and sulphamethizole. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 54–61.
- 27** Roholt K, Nielsen B, Kristensen. Pharmacokinetic studies with mecillinam and pivmecillinam. *Chemotherapy* 1975; **21**: 146–66.
- 28** Roholt K. Pharmacokinetic studies with mecillinam and pivmecillinam. *J Antimicrob Chemother* 1977; **3** Suppl B: 71–81.
- 29** Hopkins KL, Meunier D, Mustafa N *et al.* Evaluation of temocillin and meropenem MICs as diagnostic markers for OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 3641–3.
- 30** Layios N, Visee C, Mistretta V *et al.* Modelled target attainment after temocillin treatment in severe pneumonia: systemic and epithelial lining fluid pharmacokinetics of continuous versus intermittent infusions. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; **66**: e0205221.
- 31** Kresken M, Pfeifer Y, Werner G. Temocillin susceptibility in Enterobacterales with an ESBL/AmpC phenotype. *Int J Antimicrob Agents* 2021; **57**: 106223.
- 32** Livermore DM, Hope R, Fagan EJ *et al.* Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 1012–4.
- 33** Wagenlehner FM, Munch F, Pilatz A *et al.* Urinary concentrations and antibacterial activities of nitroxoline at 250 milligrams versus trimethoprim at 200 milligrams against uropathogens in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 713–21.
- 34** Wijma RA, Huttner A, Koch BCP *et al.* Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 2916–26.
- 35** Forstner C, Kwetkat A, Makarewicz *et al.* Nitroxoline in geriatric patients with lower urinary tract infection fails to achieve microbiologic eradication: a noncomparative, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2018; **24**: 434–5.
- 36** Mischnik A, Baumert P, Hamprecht A *et al.* Susceptibility to penicillin derivatives among third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae recovered on hospital admission. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; **87**: 71–3.

5. Diskussion

5.1. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Empfindlichkeit multiresistenter Enterobakterien gegenüber den drei Substanzen Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin im Kontext von Harnwegsinfektionen untersucht.

Das untersuchte Kollektiv umfasste nicht nur *E. coli*, sondern viele weitere Spezies, für die bisher zum Teil keine Breakpoints für Mecillinam, Temocillin und Nitroxolin durch das EUCAST etabliert wurden. Darunter fallen *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Klebsiella* spp., *M. morgani*, *P. mirabilis* und *Raoultella* spp.

Im Vergleich gegenüber gängigen Antibiotika wie Ceftazidim (59% R), Piperacillin/Tazobactam (41% R) oder Ciprofloxacin (54% R), zeigten die untersuchten multiresistenten Isolate eine sehr geringe bis geringe Resistenz gegenüber Mecillinam (15% R), Temocillin (13% R) und Nitroxolin (2% R).

In 5% der Fälle (n = 21) wurde zeitgleich eine Blutstrominfektion mit dem jeweiligen gleichen Erreger aus den Urinkulturen nachgewiesen. Mecillinam und Temocillin wurden in 2/21 von diesen Isolaten resistent getestet, Nitroxolin in 0/21 Isolaten. Es ist zu beachten, dass in Deutschland nur Temocillin für eine intravenöse Administration und somit zur Therapie von potenziellen Blutstrominfektionen verfügbar ist.

Mecillinam

Wir konnten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Mecillinam für Isolate von *E. coli* (3% R), *K. aerogenes* (17% R) und *Enterobacter* spp. (4% R) nachweisen. Bei Vorliegen von ESBL (insgesamt 12% R) und/oder AmpC-Überexpression (insgesamt 19% R) bestehen höhere Resistenzraten. CPE Isolate zeigten gegenüber Mecillinam nur bei den OXA-48-like Carbapenemasen (50% R) Empfindlichkeit. Letzteres bestätigen die Ergebnisse einer vorangegangenen *in vitro* Arbeit aus der unserer Arbeitsgruppe.⁴⁰ Damals wurden in einem CPE-Kollektiv (n=105 Isolate) Resistenzraten von 57 % R für Mecillinam bei OXA-48-like Isolaten erzielt.

Die nachfolgende Tabelle 6 stellt unsere Ergebnisse gegenüber anderen Arbeiten zur *in vitro* Wirksamkeit von Mecillinam. Die Ergebnisse werden im anschließenden Text diskutiert.

Tabelle 6 *in vitro* Studien zu Mecillinam

	Plambeck et al. (NRW, 2019-2020)	Kresken et al. (NRW, 2019-2020) ⁴¹	Emeraud et al. (Frankreich, 2019-2020) ⁴²	Stoltidis-Claus et al. (NRW, 2016-2021) ^{11*}	Farfour et al. (Frankreich, 2017-2018) ⁴³
Anzahl Isolate	394	460	8310	162.268	134.162
Anteil <i>E. coli</i>	50%	100%	23%	67,5%	72%
Anteil <i>K.pneumoniae</i>	16%	0%	30%	9,7%	9,7%
Resistenzraten	15%	5,2%	28,8%	29,9%	10,5 %
	<i>E. coli</i> 3%	<i>E. coli</i> 5,2%	<i>E. coli</i> 16%	<i>E. coli</i> 17,9%	<i>E. coli</i> 8,6%

* Daten zu Mecillinam nur 2019-2021

Kresken et al. untersuchten Mecillinam unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten und konnten in einem Kollektiv von 460 *E. coli* Isolaten aus Deutschland gute Resistenzraten nachweisen (5,2% R). Wir stimmen mit Kresken et al. in der These überein, dass weiterführende klinische Untersuchungen hinsichtlich Pharmakokinetik und -dynamik sowie zu Dosierungen von Mecillinam für den Status eines Erstlinientherapeutikums unabdingbar sind.⁴¹

Unsere Ergebnisse bezüglich Mecillinam werden außerdem durch Farfour et al. bestätigt, deren Untersuchung von über 100.000 Isolaten (automatisierte Testung) in 26 verschiedenen Laboratorien in Frankreich gegenüber Mecillinam eine gute *in vitro* Empfindlichkeit nach EUCAST Richtlinien (10% R) aufweist. Die Autoren halten weiterführende klinische Untersuchungen, die ein Augenmerk auf epidemiologische Basisgrößen wie Alter und Geschlecht oder antibiotische Vorbehandlung legen, für nötig.⁴³

Die vergleichsweise hohen Resistenzraten für Mecillinam bei *E. coli* Isolaten von Stoltidis et al. decken sich nicht mit unseren und bisherigen Ergebnissen (17,9% R vs. 3% R). Dieser Sachverhalt ist möglicherweise auf die automatisierte Testung zurückzuführen und weniger auf eine Resistenzentwicklung durch vermehrten Einsatz von Mecillinam.⁴⁴ Auch die hohen Resistenzraten der RKI-Daten (siehe **Tabelle 2**) sind hier nicht reproduzierbar. Möglicherweise liegt dies an der Auswahl (alle mikrobiologischen Einsendungen vs. alleinig Urinproben).¹² Emeraud et al. beschreiben ebenfalls moderate Resistenzraten (16%), allerdings bestand das

Testkollektiv ausschließlich aus carbapenem-resistenten Isolaten, womit höhere Resistenzraten zu erwarten waren.⁴²

In Hinsicht auf eine Erweiterung der BPs von Mecillinam sind weitere Untersuchungen sinnvoll, die auch eine intravenöse Applikation untersuchen. In Bezug auf die Therapie von komplizierten HWI gibt es Daten hierzu lediglich aus Dänemark.⁴⁵

Temocillin

Eine hohe Empfindlichkeit konnte gegenüber Temocillin in *P. mirabilis* (0% R), *E. coli* (4% R), *K. oxytoca* (11% R) und *K. pneumoniae* (12% R) Isolaten und in ESBL-produzierenden Enterobakterien allgemein (7% R) gezeigt werden. Gegenüber AmpC-Bildnern fallen die Resistenzraten mit 27 % R höher aus. Bei den CPE Isolaten erwies sich Temocillin als wirksam im KPC Isolat. Gegenüber OXA-48-like-Isolaten dagegen zeigte Temocillin keine Wirksamkeit (100% R), wie bereits durch Lupia et al. beschrieben. Hier wurde Temocillin als Carbapenem-Alternative mit guter Wirkung bei insbesondere ESBL-, aber auch AmpC- und KPC-Produzenten gezeigt.²⁴

Tabelle 7 stellt *in vitro* Daten zu Temocillin im Vergleich zu unseren Ergebnissen dar.

Tabelle 7 *in vitro* Studien zu Temocillin

	Plambeck et al. 2022 (NRW, 2019-2020)	Kresken et al. 2021 (NRW, 2016/17) ⁴⁶	Farfour et al. (Frankreich, 2017-2018) ⁴³
Anzahl Isolate	394	109	134.162
Anteil <i>E. coli</i>	50%	67%	72%
Anteil <i>K. pneumoniae</i>	16%	33%	9,7%
Resistenzraten	13% <i>E. coli</i> 4%	0% <i>E. coli</i> 0%	Gesamt 9,3% <i>E. coli</i> 9,5%

Ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Temocillin, unabhängig vom MDR-Status, wird durch die große Untersuchung von Farfour et al. aus Frankreich demonstriert, wobei die Resistenzrate von *E. coli* höher ausfällt (4% vs. 9,5 % R).⁴³

Höchste Empfindlichkeitsraten in einem weiteren MDR-Kollektiv wurden durch Kresken et al. beschrieben (0% R).⁴⁶

Die intravenöse Anwendbarkeit von Temocillin und die niedrigen Resistenzraten sollten Anlass für weiterführende klinische Studien sein, die insbesondere mehr Blutstrominfektionen beinhalten.

Nitroxolin

Die höchste Empfindlichkeit der drei Testsubstanzen, unabhängig von Spezies und Resistenz, wurde für Nitroxolin nachgewiesen. Nitroxolin zeigte sogar ähnlich hohe Empfindlichkeitsraten wie Meropenem und erwies sich als wirksam in allen CPE Isolaten, wie bereits durch Fuchs et Hamprecht in einem anderen CPE-Kollektiv beschrieben.²⁸ In Tabelle 8 werden verschiedene *in vitro* Studien zu Nitroxolin verglichen.

Tabelle 8 *in vitro* Studien zu Nitroxolin

	Plambeck et al. 2022 (NRW, 2019-2020)	Fuchs et al. (NRW, 2019) ²⁸	Dobrindt et al. (Limbach/Heidelberg, 2018)* ⁴⁷	Stoltidis-Claus et al. (NRW, 2016-2021) ¹¹
Anzahl Isolate	394	105	922	162.268
Anteil <i>E. coli</i>	50%	29%	75%	68%
Anteil <i>K. pneumoniae</i>	16%	44%	16%	9,7%
Resistenzraten	2%	4,8%	3%	3,9%
	<i>E. coli</i> 1%	<i>E. coli</i> 0%	<i>E. coli</i> 0,4%	<i>E. coli</i> 1,2%

*Daten zur Resistenztestung von Nitroxolin

Für Nitroxolin decken sich unsere Ergebnisse mit denen von Stoltidis-Claus et al. und Dobrindt et al. hinsichtlich der niedrigen Resistenzraten.¹¹

Es sind unsere Empfindlichkeitsraten für den Erreger *M. morganii* zu betonen (0% R). Für diesen Erreger gibt es bisher keine EUCAST BPs.

Aufgrund der sehr guten *in vitro* Empfindlichkeit der Testisolate gegenüber Nitroxolin sind Verschreibungen auch bei urogenitalen Infektionen durch andere Erreger als *E. coli* denkbar. Forstner et al. haben jedoch in einem sehr kleinen Kollektiv geriatrischer Patient/innen gezeigt, dass trotz nachgewiesener *in vitro* Sensibilität vereinzelt keine Eradikation im Urin gelang.⁴⁸ Daher sind weitere und größere *in vivo* Studien unbedingt notwendig.

5.2. Vergleich der Testverfahren

Es wurde die breit verfügbare Agardiffusion mit den aufwendigen Dilutionsverfahren verglichen.

Da falsch hohe Sensibilitätsraten in der Mecillinam-Agardiffusion für CPE-Isolate in unserer Arbeitsgruppe vorbeschrieben wurden, führten wir neben der Mikrodilution für Nitroxolin und Temocillin zusätzlich die Agardilution als Referenzverfahren für Mecillinam durch.⁴⁰ Der dort beschriebene Effekt konnte jedoch in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Vielmehr kamen wir zu dem Ergebnis einer guten Übereinstimmung der Testmodalitäten.

Im Vergleich der Verfahren Agardilution und Mikrodilution gegenüber der Agardiffusion zeigte sich folgende Rangkorrelation nach Spearman: Für Mecillinam ($r = -0.837$, $p < 0.01$) exzellent, für Temocillin ($r = -0.474$, $p < 0.01$) und Nitroxolin ($r = -0.352$, $p < 0.01$) moderat.

Diskrepanzen in den Testergebnissen, d.h. widersprüchliche Zuordnung zu Empfindlichkeiten (I statt R bzw. R statt I) in den zu vergleichenden Methoden, wurden ausschließlich für Temocillin in *M. morganii* Isolaten beobachtet ($n = 8$).

Für die übrigen Isolate für Temocillin sowie für alle Isolate für Mecillinam und Nitroxolin stimmte die Zuordnung der Isolate anhand der Bezeichnung I und R bzw. S und R überein.

Somit wurde in dieser Arbeit die Übereinstimmung der Testverfahren, sowohl in Bezug der Rangkorrelation, vor allem aber hinsichtlich der kategorialen Zuordnung, demonstriert. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da die beschriebenen Dilutionsverfahren aufwendig und kostspielig sind und Disk-Diffusionstests in der Laborroutine vorzuziehen sind.

5.3. Limitationen

Eine Limitation dieser Studie ist, dass das untersuchte Material aus Urinproben unabhängig von Indikation und Behandlungsanlass sowie -ort (unkomplizierte als auch komplizierte HWI ebenso wie asymptomatische Bakteriurie, stationär wie ambulant) stammt. Wie in Tabelle 1 (siehe Kapitel 3.1.2) aufgeführt, gibt es eine gute Übereinstimmung in den Aspekten Erregerverteilung und Häufigkeiten bzgl. Urinproben im Kontext „unkomplizierte HWI“ und Urinproben allgemein.

Daten ausschließlich zu ambulant erworbenen HWI werden jedoch voraussichtlich auch in Zukunft nur in prospektiven Studien generiert werden – da bei unkomplizierter, erstmaliger ambulanter Zystitis die Anlage einer Bakterienkultur nach Leitlinie nicht zwingend notwendig ist, weshalb kaum Real-World-Daten existieren.¹

Gerade zur Vorbereitung von klinischen Studien als auch zur kontinuierlichen Prüfung des „echten“ Erregerspektrums und der Resistenzlage sind jedoch *in vitro* Studien erforderlich. Dabei ist die Durchführung von aufwändigen „händischen“ Testungen wie in der vorliegenden Arbeit essentiell, um Ergebnisse aus automatisierten Testungen (wie bei Stoltidis-Claus et al.) abzugleichen – insbesondere bei Auftreten von Diskrepanzen wie in Kapitel 5.1 dargelegt.¹¹

5.4. Ausblick

Die vorliegende Arbeit gibt Daten zum Resistenzverhalten von multiresistenten Enterobakterien aus Urinproben gegenüber Mecillinam, Nitroxolin und Temocillin und vergleicht zusätzlich zwei Testverfahren.

Für einige der Enterobakterien liegen für die getesteten Antibiotika noch keine EUCAST Breakpoints vor. Die Arbeit generiert somit Daten zur Definition neuer Breakpoints.

Eine Erweiterung der Breakpoints bildet die Grundlage für klinische Studien zur Wirksamkeit der Antibiotika, die wiederum erforderlich sind, um Verordnungsempfehlungen abgeben zu können. Eine Aktualisierung der S3-Leitlinie für unkomplizierte HWI steht zur Zeit aus.

Klinische Studien können im Verlauf zu einem häufigeren Einsatz von Mecillinam, Nitroxolin oder Temocillin führen.

Dies wäre ein wichtiger Schritt, Breitspektrumantibiotika einzusparen und der Selektion multiresistenter Enterobakterien vorzubeugen.

6. Literaturverzeichnis

1. Leitlinienprogramm DGU: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017 AWMF Registernummer: 043/044. https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-044|_S3_Harnwegsinfektionen_2017-05.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
2. Vik I, Bollestad M, Grude N, et al. Ibuprofen versus pivmecillinam for uncomplicated urinary tract infection in women-A double-blind, randomized non-inferiority trial. *PLoS Med* 2018; **15**(5): e1002569.
3. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 2019; **8**(2).
4. Wissenschaftliches Institut der AOK (WIdO) PharMaAnalyst. Aktualisiert am 02.06.2023. 2023. <https://arzneimittel.wido.de/PharMaAnalyst/> (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
5. Maucher IV. Temocillin. Gelbe Liste. 2019. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Temocillin_596 (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
6. Bodmann KF, Grabein B, Kresken M, et al. S2k Leitlinie. Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen - Update 2018. 2. aktualisierte Version, erstellt am 25. Juli 2019. Register-Nr. 082-006. 25.07.2019 2019. https://register.awmf.org/assets/guidelines/082-006|_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08-verlaengert.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
7. El Sakka N, Gould IM. Role of old antimicrobial agents in the management of urinary tract infection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016; **9**(8): 1047-56.
8. Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO.SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**(1): 45-51.
9. Naber KG, Schito G, Botto H, Palou J, Mazzei T. Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. *Eur Urol* 2008; **54**(5): 1164-75.
10. Klingeberg A, Noll I, Willrich N, et al. Antibiotic-Resistant E. coli in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Dtsch Arztebl Int* 2018; **115**(29-30): 494-500.
11. Stoltidis-Claus C, Rosenberger KD, Mandraka F, et al. Antimicrobial resistance of clinical Enterobacterales isolates from urine samples, Germany, 2016 to 2021. *Euro Surveill* 2023; **28**(19).
12. Robert Koch Institut (RKI). Antibiotika Resistenz Surveillance. 2019. <https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceOverview.aspx> (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
13. Schulz M, Kern WV, Hering R, Schulz M, Bätzing-Feigenbaum J. Antibiotikaverordnungen in der ambulanten Versorgung in Deutschland bei bestimmten Infektionserkrankungen Teil 2 - Krankheitsspezifische Analyse von Qualitätsindikatoren auf regionaler Ebene. 2014. https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva_docs/46/Antibiotika_best_Infektionskrankheiten_Nebenbericht.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

14. Holstiege J, Schulz M, Akmatov MK, Kern WV, Steffen A, Bätzing J. The decline in outpatient antibiotic use—an analysis of nationwide prescription data from 2010 to 2018. *Dtsch Arztebl Int* 2020; **117**: 679–86.
15. Suerbaum S, Hornef M, Karch H. Enterobakterien. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020: 299-335.
16. Pfeifer Y. ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache für Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien. *Epid Bull* 2017; **Nr. 28**: 247-50.
17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**(6): 1211-33.
18. Pfeifer Y. ESBL, AmpC und Carbapenemasen: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik β -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger. *J Lab Med* 2010; **34**: 205–15.
19. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). SURVEILLANCE REPORT. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report. 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2020.pdf> (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
20. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
21. Kahle C. Pivmecillinam. Gelbe Liste. 2016. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Pivmecillinam_26112 (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
22. Lund F, Tybring L. 6 -amidinopenicillanic acids--a new group of antibiotics. *Nat New Biol* 1972; **236**(66): 135-7.
23. Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH, et al. BRL 17421, a novel beta-lactam antibiotic, highly resistant to beta-lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**(1): 38-46.
24. Lupia T, De Benedetto I, Stroffolini G, et al. Temocillin: Applications in Antimicrobial Stewardship as a Potential Carbapenem-Sparing Antibiotic. *Antibiotics (Basel)* 2022; **11**(4).
25. Slocombe B, Cooper CE, Griffin KE, White AR. Temocillin. In vitro antibacterial activity. *Drugs* 1985; **29 Suppl 5**: 49-56.
26. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**(10): 899-905.
27. Maucher IV. Nitroxolin. Gelbe Liste. 2020. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Nitroxolin_822 (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).
28. Fuchs F, Hamprecht A. Susceptibility of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) to nitroxoline. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**(10): 2934-7.
29. Fuchs F, Aldejohann AM, Hoffmann AM, Walther G, Kurzai O, Hamprecht AG. In Vitro Activity of Nitroxoline in Antifungal-Resistant Candida Species Isolated from the Urinary Tract. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; **66**(6): e0226521.
30. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 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 (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Disk diffusion method.

Version 10.0 January 2022.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Manual_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2022.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

32. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**(4): 493-6.

33. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Reading guide for broth microdilution.

Version 4.0 January 2022.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Reading_guide_BMD_v_4.0_2022.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

34. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Media preparation. Disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method, Version 6.0 January 2020.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Media_preparation_v_6.0_EUCAST_AST.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

35. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Reading guide. disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing.

Version 9.0 January 2022.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Reading_guide_v_9.0_EUCAST_Disk_Test_2022.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

36. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1.0. December 2013.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

37. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**(10): 1286 e9- e15.

38. Hamprecht A, Vehreschild JJ, Seifert H, Saleh A. Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 2018; **13**(9): e0204157.

39. Hamprecht A, Kresken M, Mack D, Molitor E, Gatermann S. Nationales Antibiotika-Sensitivitätstest-Komitee (NAK). Empfehlungen zur Detektion von Carbapenemasen bei Enterobakterien (Enterobacterales). 2021. https://www.nak-deutschland.org/tl_files/nak-deutschland/NAK%202021/Vorgehen_Carbapenemase_NAK_20210930.pdf (zuletzt abgerufen: 08.10.2023).

40. 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.
41. Kresken M, Pfeifer Y, Wagenlehner F, Werner G, Wohlfarth E, Therapy OR. Resistance to Mecillinam and Nine Other Antibiotics for Oral Use in Escherichia coli Isolated from Urine Specimens of Primary Care Patients in Germany, 2019/20. *Antibiotics (Basel)* 2022; **11**(6).
42. Emeraud C, Godmer A, Girlich D, et al. Activity of mecillinam against carbapenem-resistant Enterobacterales. *J Antimicrob Chemother* 2022; **77**(10): 2835-9.
43. Farfour E, Dortet L, Guillard T, et al. Antimicrobial Resistance in Enterobacterales Recovered from Urinary Tract Infections in France. *Pathogens* 2022; **11**(3).
44. Frimodt-Møller N, Simonsen GS, Larsen AR, Kahlmeter G. Pivmecillinam, the paradigm of an antibiotic with low resistance rates in Escherichia coli urine isolates despite high consumption. *J Antimicrob Chemother* 2022; **78**(1): 289-95.
45. Koumaki V, Dokoumetzidis A, Angelero MGF, Baka S, Balakrishnan I, Tsakris A. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Determination of Systemic MIC Breakpoints for Intermittent, Extended, and Continuous Infusion Dosage Regimens of Mecillinam. *Microbiol Spectr* 2023; **11**(2): e0344122.
46. Kresken M, Pfeifer Y, Werner G. Comparative in vitro activity of piperacillin-tazobactam and temocillin against third-generation cephalosporin-resistant, carbapenem-susceptible Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *GMS Infect Dis* 2021; **9**.
47. Dobrindt U, Wami HT, Schmidt-Wieland T, Bertsch D, Oberdorfer K, Hof H. Compared with Cotrimoxazole Nitroxoline Seems to Be a Better Option for the Treatment and Prophylaxis of Urinary Tract Infections Caused by Multidrug-Resistant Uropathogens: An In Vitro Study. *Antibiotics (Basel)* 2021; **10**(6).
48. Forstner C, Kwetkat A, Makarewicz O, et al. Nitroxoline in geriatric patients with lower urinary tract infection fails to achieve microbiologic eradication: a noncomparative, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2018; **24**(4): 434-5.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Resistenzraten <i>E. coli</i> bzgl. 3GC, 2019.....	18
Abbildung 2 Resistenzraten <i>K. pneumoniae</i> bzgl. 3GC, 2019	18
Abbildung 3 Resistenzraten <i>E. coli</i> bzgl. Carbapenemen, 2019	18
Abbildung 4 Resistenzraten <i>K. pneumoniae</i> bzgl. Carbapenemen, 2019.....	18
Abbildung 5 Strukturformel Mecillinam.....	19
Abbildung 6 Strukturformel Temocillin.....	20
Abbildung 7 Strukturformel Nitroxolin.....	20
Abbildung 8 Schematische Darstellung einer 96-Wells-Platte (Mikrodilution).....	23
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Agardilution für Mecillinam	23
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Agardiffusion	24

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Typische Erreger von HWI bzw. Keimnachweise in Urinproben und deren Häufigkeiten	13
Tabelle 2 Resistenzraten ausgewählter Bakterien und Antibiotika in Prozent	14
Tabelle 3 Empfohlene Antibiotika bei unkomplizierter unterer Harnwegsinfektion....	15
Tabelle 4 Einteilung der Carbapenemasen/ β -Laktamasen nach Ambler	17
Tabelle 5 Aktuelle EUCAST Breakpoints 2023	21
Tabelle 6 <i>in vitro</i> Studien zu Mecillinam	36
Tabelle 7 <i>in vitro</i> Studien zu Temocillin.....	37
Tabelle 8 <i>in vitro</i> Studien zu Nitroxolin	38

7.3. Lebenslauf

Digital nicht verfügbar.

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID)

Wien. Juni 2021: ePoster+Abstract

***In vitro* susceptibility of mecillinam and temocillin in MDR Enterobacterales**