

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Einfluss von Polymorphismen im *penA*-Gen auf das  
Resistenzverhalten von  
*Neisseria lactamica* und *Neisseria meningitidis***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
André Karch  
aus Schweinfurt

Würzburg, September 2011

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel

Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2012

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 1 -
1.1 <i>Neisseria meningitidis</i> und <i>Neisseria lactamica</i> .....	- 1 -
1.2 Klinik und Therapie von Meningokokkenerkrankungen .....	- 3 -
1.3 Resistenzverhalten und - mechanismen bei <i>Neisseria meningitidis</i> und <i>Neisseria lactamica</i> .....	- 5 -
1.3.1 Sensibilität und Resistenz von <i>N. meningitidis</i> gegenüber bei Meningokokkeninfektionen verwendeten Antibiotika .....	- 5 -
1.3.2 Sensibilität und Resistenz von <i>N. lactamica</i> gegenüber bei Meningokokkeninfektionen verwendeten Antibiotika .....	- 7 -
1.3.3 Molekulare Grundlagen der herabgesetzten Sensibilität von <i>N.</i> <i>meningitidis</i> gegenüber Penicillin G .....	- 7 -
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	- 9 -
2. Material und Methoden.....	- 10 -
2.1 Geräte .....	- 10 -
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 11 -
2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	- 11 -
2.4 Puffer und Lösungen .....	- 12 -
2.5 Bakterienkultivierung.....	- 13 -
2.5.1 Nährmedien .....	- 13 -
2.5.2 Agarplatten .....	- 14 -
2.5.3 Wachstumsbedingungen.....	- 14 -
2.6 Oligonukleotide .....	- 14 -
2.7 Ablauf der phänotypischen und genotypischen Analyse sowie hierfür verwendete Bakterienstämme.....	- 15 -
2.8 Phänotypische Testverfahren .....	- 15 -
2.8.1 Resistenztestung mittels Etest .....	- 15 -
2.8.2 Definition von Sensibilität, intermediärer Resistenz und Resistenz gegenüber Penicillin G .....	- 16 -
2.8.3 Test auf $\beta$ -Lactamase-Produktion .....	- 16 -
2.9 Genotypische Testverfahren.....	- 17 -
2.9.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion) .....	- 17 -

2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 18 -
2.9.3	Bestimmung der DNA-Menge .....	- 19 -
2.9.4	DNA-Aufreinigung.....	- 19 -
2.9.5	DNA-Sequenzierung .....	- 19 -
2.9.6	Sequenzanalyse und <i>penA</i> -Datenbank.....	- 20 -
2.9.7	Phylogenetische Analyse.....	- 20 -
2.10	Genetische Transformation von Neisserien .....	- 21 -
2.10.1	Isolation chromosomaler DNA.....	- 21 -
2.10.2	Transformation von Meningokokken .....	- 21 -
2.10.3	Ablauf der Transformationsexperimente.....	- 22 -
2.11	Statistische Analyse.....	- 23 -
2.12	Verwendete Computerprogramme .....	- 24 -
3.	Ergebnisse.....	- 25 -
3.1	Phänotypische Analyse.....	- 25 -
3.1.1	Ergebnisse der Resistenztestung.....	- 25 -
3.1.2	Untersuchungen innerhalb der Spezies <i>N. lactamica</i> .....	- 27 -
3.2	Genotypische Analyse.....	- 31 -
3.2.1	Ergebnisse der <i>penA</i> -Untersuchung bei <i>N. meningitidis</i> .....	- 31 -
3.2.3	Ergebnisse der <i>penA</i> -Untersuchung bei <i>N. lactamica</i> .....	- 33 -
3.2.4	Vergleich der genotypischen Analyse bei <i>N. lactamica</i> und <i>N. meningitidis</i> .....	- 37 -
3.3	Phylogenetische Analyse.....	- 38 -
3.4	Transformationsexperimente.....	- 40 -
3.4.1	Ergebnisse des Transformationsexperiments mit DNA aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel.....	- 41 -
3.4.2	Ergebnisse des Transformationsexperiments mit DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 5/5-Polymorphismus-Allel .....	- 43 -
3.4.3	Ergebnisse des Transformationsexperiment mit DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 3/5-Polymorphismus-Allel .....	- 44 -
3.4.4	Vergleich und Zusammenfassung der Transformationsergebnisse..	- 45 -
4.	Diskussion.....	- 47 -
5.	Zusammenfassung .....	- 55 -

6. Verzeichnisse .....	- 57 -
6.1 Literaturverzeichnis .....	- 57 -
6.2 Abbildungsverzeichnis .....	- 66 -
6.3 Tabellenverzeichnis .....	- 68 -
6.4 Abkürzungsverzeichnis .....	- 69 -
7. Anhang .....	- 71 -
7.1 Untersuchte <i>N. lactamica</i> -Stämme dieser Studie .....	- 71 -
7.2 Untersuchte <i>N. meningitidis</i> -Stämme dieser Studie .....	- 73 -
7.3 Im Rahmen der Transformationsversuche eingesetzte <i>N. meningitidis</i> -Stämme .....	- 76 -
7.4 Ergebnisse der paarweisen Bonferroni-korrigierten Wilcoxon- Rangsummentests zum Vergleich der MIC-Werte in verschiedenen Städten .....	- 77 -
8. Danksagung .....	
9. Lebenslauf .....	

## 1. Einleitung

### 1.1 *Neisseria meningitidis* und *Neisseria lactamica*

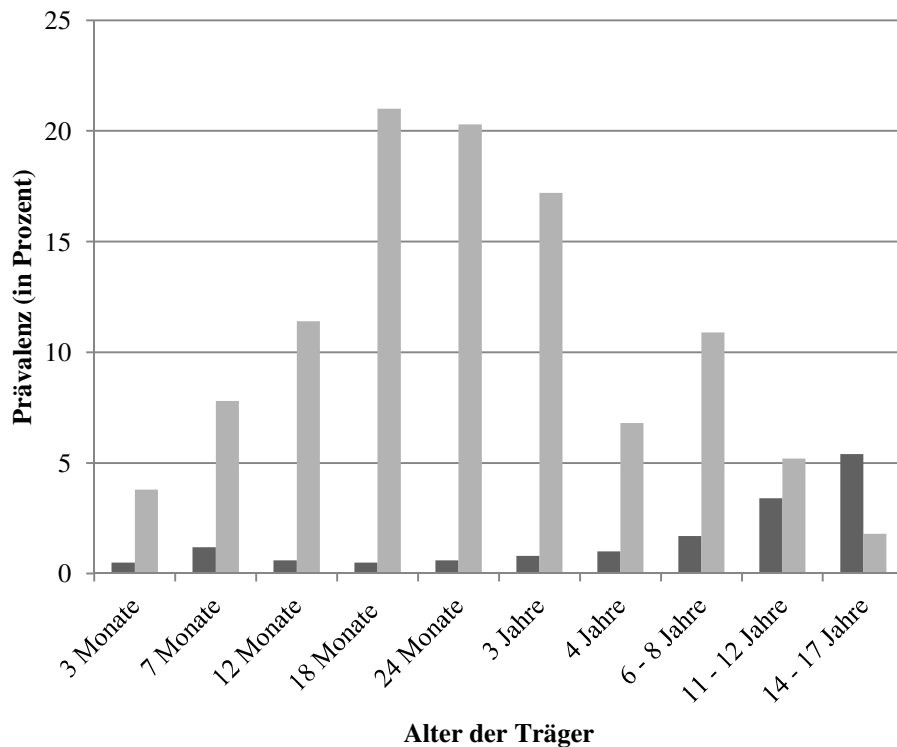
Im klinischen Alltag wie auch in der mikrobiologischen Forschung spielen Vertreter der Gattung der Neisserien eine wichtige Rolle. Das Genus umfasst insgesamt 20 bekannte Spezies, von denen jedoch einzig Gonokokken und Meningokokken humanpathogen sind (Feil *et al.*, 1999). Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen mit *Neisseria lactamica* und *Neisseria meningitidis* ein apathogener und ein pathogener Vertreter der Neisserien.

*Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das den menschlichen Nasopharynx kolonisiert. Anhand der Polysaccharidkapsel lassen sich 12 verschiedene Serogruppen unterscheiden, von denen nur sechs (A, B, C, W-135, X und Y) für den Menschen Krankheitswert besitzen (Rosenstein *et al.*, 2001). In verschiedenen Studien konnten 5 bis 30% der Bevölkerung als asymptomatische Träger von Meningokokken identifiziert werden (Cartwright *et al.*, 1987; Claus *et al.*, 2005; Gold *et al.*, 1978; Sim *et al.*, 2000). *N. meningitidis* ist in seltenen Fällen für die Entstehung von schweren Erkrankungen wie Meningitis und Sepsis verantwortlich (Rosenstein *et al.*, 2001).

*Neisseria lactamica* (*N. lactamica*) ist mit *N. meningitidis* genetisch eng verwandt und besiedelt natürlicherweise ebenfalls den menschlichen Nasopharynx (Alber *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2007; Guibourdenche *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu *N. meningitidis* ist *N. lactamica* allerdings ein apathogener Vertreter seiner Gattung. Erkrankungen, welche auf Infektionen mit *N. lactamica* zurückzuführen sind, besitzen Seltenheitswert und sind nur von akademischem Interesse (Denning & Gill, 1991; Greenberg & Kleinerman, 1978; Hansman, 1978; Lauer & Fisher, 1976). Durch die namensgebende Fähigkeit Laktose zu Laktat zu verstoffwechseln ist eine Unterscheidung von anderen Neisserienspezies mit einfachen Mitteln möglich (Appelbaum & Lawrence, 1979; Lauer & Fisher, 1976).

Die Unterschiede zwischen den beiden in dieser Studie betrachteten Spezies liegen allerdings nicht nur in ihrer Pathogenität, sondern auch im Spektrum ihrer potenziellen Träger. Während Meningokokken vor allem bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen zu finden sind, besiedelt *N. lactamica* bevorzugt Klein- und Schulkinder (Bennett *et al.*, 2005; Cartwright *et al.*, 1987; Gold *et al.*, 1978). In einer Studie von Gold *et al.* aus dem

Jahr 1978 konnte an einer Gesamtpopulation von 2969 Kindern und Jugendlichen im Alter von drei Monaten bis 17 Jahren gezeigt werden, dass der Anteil der Meningokokkenträger in der Altersgruppe von 14 bis 17 Jahren am höchsten war (5,4%). Bei *N. lactamica* hingegen konnten die höchsten Trägerraten (21,0% bzw. 20.3%) für die Altersgruppen von 18 und 24 Monaten nachgewiesen werden (Abb. 1).



**Abb. 1:** Prävalenz des Trägertums von *N. meningitidis* (dunkelgraue Balken) und *N. lactamica* (hellgraue Balken) in verschiedenen Altersgruppen. Diagramm modifiziert nach (Gold *et al.*, 1978).

*N. lactamica*, dessen vollständiges Genom im Jahr 2010 offiziell publiziert wurde, ist aus unterschiedlichen Gründen in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt (Bennett *et al.*, 2010). Zum Einen sind die genetischen Unterschiede zwischen beiden Spezies so gering, dass Antigene von *N. lactamica* als mögliche Ziele für die Impfstoffentwicklung gegen *N. meningitidis* getestet werden (Gorringe, 2005; Gorringe *et al.*, 2009; Maiden, 2008). Andererseits sind es gerade die geringen Unterschiede zwischen beiden Spezies, die eine entscheidende Rolle für das vollständige Verständnis der Pathogenität von *N. meningitidis* spielen könnten.



## 1.2 Klinik und Therapie von Meningokokkenerkrankungen

Obwohl *N. meningitidis* ein häufiger Vertreter der menschlichen Rachenflora ist, treten invasive Meningokokkeninfektionen relativ selten auf (Rosenstein *et al.*, 2001). Wenn sie allerdings stattfinden, sind die damit verbundenen Erkrankungen zumeist schwerwiegend. Am häufigsten – bei ungefähr der Hälfte aller Patienten - tritt infolge einer Infektion mit Meningokokken die namensgebende Meningitis auf, welche rasch progredient ist und nicht selten tödlich oder mit bleibenden neurologischen Ausfällen endet (Rosenstein *et al.*, 1999). Bei 5-20% aller Patienten kommt es zusätzlich zum Auftreten einer sogenannten Meningokokkensepsis, welche primär mit plötzlich einsetzenden Fieberschüben und petechialen Hautblutungen verknüpft ist (Gold, 1987; Rosenstein *et al.*, 1999). Als Vollbild einer Meningokokkensepsis kann das Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom betrachtet werden, bei dem es im Rahmen einer generalisierten Verbrauchskoagulopathie unter anderem zu Nebennierenblutungen kommen kann (Brandtzaeg *et al.*, 1989; Gold, 1987). Trotz adäquater antibiotischer und intensivmedizinischer Behandlung verbleibt die Letalität invasiver Meningokokkeninfektionen mit 9-12% auf einem hohen Niveau. Bei septischem Verlauf der Erkrankung versterben sogar bis zu 40% der Betroffenen (Rosenstein & Perkins, 2000). Ein beachtlicher Anteil (11-19%) der Patienten, die eine invasive Meningokokkeninfektion überleben, leidet in der Folge unter einer dauerhaften Behinderung, wobei bei der Mehrzahl der Fälle Einschränkungen des Hörvermögens oder andere neurologische Ausfälle vorliegen (Edwards & Baker, 1981; Kirsch *et al.*, 1996).

Infektionen mit Meningokokken spielen weiterhin eine bedeutende Rolle für die weltweite Gesundheitsversorgung. Neben den regelmäßig im afrikanischen Meningokokkengürtel stattfindenden Epidemien mit Erregern der Serogruppe A rückten im Laufe der letzten Jahrzehnte weltweit vermehrt Ausbrüche mit Meningokokken der Serogruppen W-135, X und Y in den Fokus (Raghunathan *et al.*, 2006; Rosenstein *et al.*, 2001). In der westlichen Welt treten zumeist sporadische Infektionen mit Meningokokken der Serogruppen B und C auf, wobei fulminante Verläufe und septische Komplikationen hier deutlich häufiger als bei den anderen Serogruppen vorkommen (Caugant, 1998; Stephens *et al.*, 2007).

Neben einem guten intensivmedizinischen Management ist gerade die frühe Einleitung einer adäquaten antibiotischen Therapie für die weitere Prognose der Patienten von besonderer Bedeutung (Booy *et al.*, 2001; Goldacre *et al.*, 2003). Zu den effektiv wirksamen Antibiotika gegen Meningokokkenerkrankungen zählt man neben Penicillin G auch Ceftriaxon, Cefotaxim und Chloramphenicol (Stephens *et al.*, 2007).

Unter Anderem aufgrund seines Nebenwirkungsprofils spielt Chloramphenicol im klinischen Alltag in Europa und Nordamerika keine große Rolle mehr. Bei epidemischen Ausbrüchen in Entwicklungsländern wird es aber weiterhin eingesetzt, da eine einmalige intramuskuläre Injektion in ihrer Effektivität mit einer fünftägigen parenteralen Penicillintherapie vergleichbar ist (Pecoul *et al.*, 1991).

In der westlichen Welt wird bei klinischen Hinweisen auf eine Meningitis je nach zu erwartenden Erregern, Patientenalter und nationaler Resistenzlage leitliniengerecht eine Kombinationstherapie eingesetzt, an der auch ein Cephalosporin der dritten Generation beteiligt ist (Nadel & Kroll, 2007; Quagliarello & Scheld, 1997). Beim Nachweis von Meningokokken als Erreger wird meist das schon begonnene Therapieregime fortgeführt, manchmal erfolgt jedoch auch – nicht zuletzt aus Kostengründen - eine Umstellung auf Penicillin G, das weiterhin als first-line Antibiotikum gegen eine mikrobiologisch nachgewiesene Meningokokkeninfektionen empfohlen wird (Nadel & Kroll, 2007; Rosenstein *et al.*, 2001). Während in Mitteleuropa Cephalosporine der dritten Generation aufgrund ihres breiteren Wirkungsspektrums gegenüber differentialdiagnostisch wichtigen Keimen Penicillin G zumindest bei der initialen Meningitistherapie verdrängt haben, spielt Penicillin G in großen Teilen der Welt auch heute noch die entscheidende Rolle bei der Behandlung von Meningokokkeninfektionen. Neben den regional unterschiedlichen Erregerspektren sind es vor allem Versorgungs- und Kostenprobleme, die den Einsatz von Penicillin G unverzichtbar machen.

Eine weitere wichtige Rolle in der Versorgung von Patienten mit invasiven Meningokokkenerkrankungen spielt die Chemoprophylaxe von nahen Kontaktpersonen. Während sie in Entwicklungsländern selten durchgeführt wird und von der WHO auch nicht empfohlen wird, kommt ihr in der westlichen Welt eine besondere Bedeutung bei der Verhinderung von Ausbruchsklustern zu (World Health Organization, 2007). Empfohlen werden hierbei Rifampicin und Ciprofloxacin, welches wegen der

einfacheren Handhabung und dem besseren Nebenwirkungsprofil zunehmend eingesetzt wird (Stephens *et al.*, 2007). Das ebenfalls empfohlene Ceftriaxon findet nur in speziellen Situationen (z.B. Schwangerschaft) Verwendung, da es als intramuskuläre Injektion gegeben werden muss.

### **1.3 Resistenzverhalten und -mechanismen bei *Neisseria meningitidis* und *Neisseria lactamica***

#### **1.3.1 Sensibilität und Resistenz von *N. meningitidis* gegenüber bei Meningokokkeninfektionen verwendeten Antibiotika**

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien hat sich *N. meningitidis* bisher nicht dadurch ausgezeichnet, schnell Resistenzen gegenüber eingesetzten Antibiotika zu entwickeln. Meningokokken sind zwar in bis zu 25% der Fälle resistent gegenüber Sulfonamiden, bei den übrigen klassischerweise eingesetzten Antibiotika spielten Resistenzen in der Vergangenheit allerdings keine entscheidende Rolle (Antignac *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005).

Im Laufe des letzten Jahrzehntes konnten jedoch in unterschiedlichen Regionen der Welt Meningokokkenstämme mit einer Resistenz gegenüber Chloramphenicol nachgewiesen werden (Galimand *et al.*, 1998; Shultz *et al.*, 2003). Dies führte dazu, dass Chloramphenicol nun auch immer mehr in seinem verbliebenen Einsatzgebiet – der Epidemiekontrolle in Entwicklungsländern – von Cephalosporinen der dritten Generation verdrängt wird, welche ebenfalls eine intramuskuläre Einmaltherapie erlauben. Gegenüber Ceftriaxon und Cefotaxim scheinen Meningokokken bisher noch ausnahmslos sensibel zu sein. Zwar gibt es eine indische Studie, in der von acht Ceftriaxon-resistenten *N. meningitidis*-Stämmen berichtet wird, allerdings wurden jene Isolate noch keiner weiteren bestätigenden Untersuchung in einem anerkannten Referenzzentrum unterzogen (Manchanda & Bhalla, 2006; Nicolas *et al.*, 2007).

Auch Rifampicin-resistente Isolate konnten in den letzten Jahren identifiziert werden (Arreaza *et al.*, 2000; Oppenheim, 1997; Stefanelli *et al.*, 2001; Taha *et al.*, 2010; Yagupsky *et al.*, 1993). Allerdings sind diese verhältnismäßig selten und die tatsächliche klinische Relevanz ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Zusätzlich erschwert wurde die korrekte Beurteilung der sich darstellenden Situation dadurch, dass

es für Rifampicin bisher keine allgemeingültigen internationalen Breakpoints gab (Taha *et al.*, 2010). In einer multizentrischen Studie versuchen Taha *et al.* diese im Rahmen der European Monitoring Group on Meningococci (EMGM) nun zumindest für Europa zu definieren. Ähnlich stellt sich die Studienlage zu Meningokokkenstämmen mit herabgesetzter Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin dar, welches alternativ zu Rifampicin zur Chemoprophylaxe in der westlichen Welt eingesetzt werden kann (Alcala *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2007; Corso *et al.*, 2005; Skoczynska *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2008). Im Jahr 2007 wurden erstmals Cluster von Ciprofloxacin-resistenten Meningokokken in den USA beschrieben (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008). In Folge dessen wird Ciprofloxacin in einigen US-Bundesstaaten seither nicht mehr zur Chemoprophylaxe empfohlen.

Eine Sonderrolle nimmt das Resistenzverhalten von Meningokokken gegenüber Penicillin G ein. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien blieben Meningokokken lange sensibel gegenüber diesem häufig eingesetzten Antibiotikum (Tapsall *et al.*, 2001; Vazquez, 2001). Im Laufe der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurden jedoch in verschiedenen Ländern erstmals Stämme mit herabgesetzter Penicillinsensibilität beobachtet (Botha, 1988; Sutcliffe *et al.*, 1988; Van Esso *et al.*, 1987). Gerade in den letzten Jahren ist es zu einem gehäuften Auftreten solcher Isolate gekommen (Richter *et al.*, 2001; Taha *et al.*, 2006; Tapsall *et al.*, 2001; Vazquez, 2001). In Deutschland waren im Zeitraum 2003 bis 2006 14% der an das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken (NRZM) gesandten Stämme nicht mehr sensibel gegenüber Penicillin (Vogel *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2009). In anderen Ländern – beispielhaft sei hier Spanien erwähnt – waren phasenweise mehr als 50% aller untersuchten Stämme betroffen (Vazquez, 2001). Intermediäre Resistenz gegenüber Penicillin spielt gerade bei Meningokokkeninfektionen eine besondere Rolle, da bei der Behandlung einer Meningokokkenmeningitis Bakterien im Liquor getötet werden müssen, in dem nur schwer hohe Penicillinkonzentrationen erreicht werden können (Cartwright, 1995; Maiden, 1998).

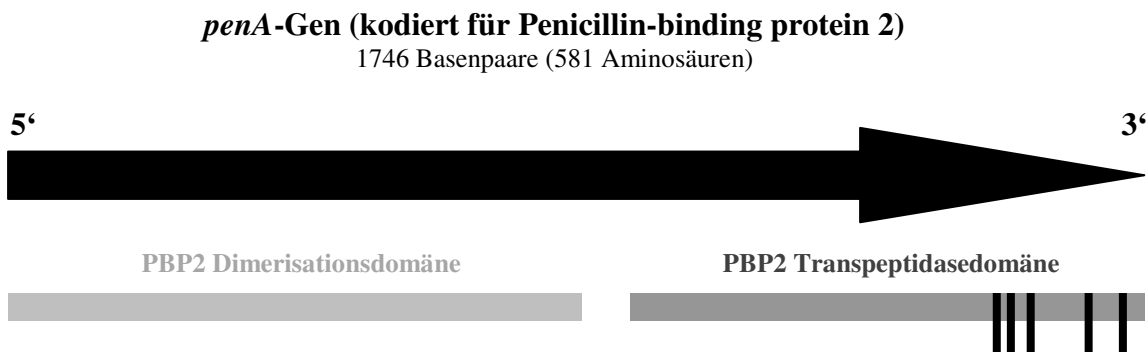
### **1.3.2 Sensibilität und Resistenz von *N. lactamica* gegenüber bei Meningokokkeninfektionen verwendeten Antibiotika**

Bisher war ein Interesse an epidemiologischen Daten über Antibiotikaresistenzen bei *N. lactamica* in der internationalen Forschung nur bedingt erkennbar. So liegt auch nur eine monozentrische spanische Studie vor, die sich diesem Thema widmet (Arreaza *et al.*, 2002). Betrachtet man das in dieser Studie beobachtete Resistenzverhalten von *N. lactamica* gegenüber Antibiotika, die bei Meningokokkeninfektionen eingesetzt werden, so zeigt sich auf den ersten Blick ein ähnliches Bild wie bei *N. meningitidis* selbst. Gegenüber Ceftriaxon und Cefotaxim waren alle 286 untersuchten Stämme sensibel, bei Rifampicin und Ciprofloxacin konnten einige wenige (zwei bzw. sechs) intermediär resistente Isolate identifiziert werden. Weitaus interessanter sind die Ergebnisse für Penicillin und Ampicillin. Bei beiden Antibiotika wurden keine sensiblen Stämme gefunden. Während bei Penicillin alle 286 Isolate als intermediär resistent definiert wurden, wurden fünf Stämme sogar als resistent gegenüber Ampicillin eingestuft. Betrachtet man die Spannweite der zugrundeliegenden Resistenzlevels gegenüber Penicillin G (0,12 – 1,0 µg/ml), so würden bei Anwendung der Kriterien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) einige Stämme sogar als resistent bezeichnet werden (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007; Vazquez, 2007).

### **1.3.3 Molekulare Grundlagen der herabgesetzten Sensibilität von *N. meningitidis* gegenüber Penicillin G**

Das zunehmende Auftreten von Meningokokkenstämmen, die nur noch eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber dem first-line-Therapeutikum Penicillin zeigten, führte zu einer regen Forschung an den möglichen Ursachen einer solchen Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei das vom *penA*-Gen kodierte Penicillin-binding protein 2 (PBP2) eine zentrale Rolle spielt (Saez-Nieto *et al.*, 1992). Das PBP2 ist eine der Zielstrukturen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, welche durch Komplexbindung der Penicillinbindungsproteine zu einer Störung der Zellwandsynthese und damit zum Zelltod führen (Zhang *et al.*, 1990). Im Rahmen von vergleichenden genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Auftreten intermediär resistenter Stämme vor allem mit fünf spezifischen Mutationen im *penA*-Gen verbunden

ist (Taha *et al.*, 2007; Thulin *et al.*, 2006). Diese Mutationen sind in dem für die Transpeptidasedomäne des Proteins kodierenden Genabschnitt angesiedelt (Abb. 2). Sie können durch eine Routine-PCR identifiziert werden, welche die letzten 402 Basenpaare des *penA*-Gens umfasst. Alle nicht-sensiblen Meningokokkenstämme werden deshalb am Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken (NRZM) mit Hilfe dieser PCR auf ihr *penA*-Allel hin untersucht.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des *penA*-Gens. Die fünf Punktmutationen in dem für die PBP-Transpeptidaseregion kodierenden Genabschnitt (Aminosäurepositionen: 504, 510, 515, 541, 566), die bei Meningokokken mit herabgesetzter Penicillinsensibilität assoziiert sind, werden von fünf schwarzen Strichen repräsentiert.

Bei der Suche nach dem Entstehungsweg dieser Polymorphismen im *penA*-Gen rückten auch kommensale *Neisseria spp.* in den Mittelpunkt des Interesses. Alle Vertreter der Neisserien verfügen über die natürliche Kompetenz zu horizontalem Gentransfer (Hanage *et al.*, 2005; Maiden, 2008; Spratt *et al.*, 1989; Spratt *et al.*, 1992). Diese Fähigkeit ermöglicht sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen verschiedenen Spezies den Austausch von Genabschnitten bzw. ganzen Genen. Benötigt werden hierbei sogenannte *DNA uptake Sequenzen* (DUS), welche über das ganze Genom verteilt sind (Davidsen *et al.*, 2004; Hanage *et al.*, 2006; Treangen *et al.*, 2008). Bei Neisserien besteht ein solcher Genaustausch homologer Abschnitte zwischen den einzelnen Spezies, welcher sich im Vorhandensein gemeinsamer Genpools niederschlägt (Hanage *et al.*, 2005).

Wiederholt konnte gezeigt werden, dass kommensale *Neisseria spp.* über horizontalen Gentransfer an der Entstehung veränderter *penA*-Allele beteiligt sein könnten (Bowler *et al.*, 1994; Spratt *et al.*, 1989; Vazquez, 2001). Auch für *N. lactamica* liegen Daten

vor, die darauf hindeuten, dass ein solcher *penA*-Transfer stattgefunden hat (Lujan *et al.*, 1991; Saez-Nieto *et al.*, 1990; Spratt *et al.*, 1992). Untersuchungen, die auf die von Taha *et al.*, 2007 proklamierten fünf spezifischen Mutationen eingehen, wurden bisher nicht durchgeführt.

#### **1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Durch die von Arreaza *et al.* in Spanien durchgeführte Studie konnte gezeigt werden, dass *N. lactamica* ein deutlich höheres Resistenzniveau gegenüber Penicillin aufweist als *N. meningitidis* (Arreaza *et al.*, 2002). In den letzten Jahren wurden allerdings auch immer häufiger bei den ursprünglich sensiblen Meningokokken intermediär resistente Isolate beobachtet. Diese Isolate sind gekennzeichnet durch fünf spezifische Mutationen in dem für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierenden Abschnitts des *penA*-Gens, welche leicht über eine Routine-PCR nachzuweisen sind (Taha *et al.*, 2007). Beide Spezies teilen sich mit dem menschlichen Nasopharynx denselben Lebensraum. Horizontaler Gentransfer wurde sowohl für die verschiedenen *Neisseria spp.* wie auch für das *penA*-Gen nachgewiesen. Die Rolle des *penA*-Gens für die Penicillinresistenz von *N. lactamica* ist ebenso wenig untersucht wie die *penA*-Allele der verschiedenen kommensalen *Neisseria spp.*.

Fragestellung und Aufgabe dieser Arbeit war es, die Ausprägung der *penA*-Allele bei *N. lactamica* zu untersuchen und die Ergebnisse dieser Analyse mit den bei Meningokokken beobachteten *penA*-Allelen zu vergleichen. Zudem sollte untersucht werden, ob ein gemeinsamer *penA*-Genpool für *N. lactamica* und *N. meningitidis* existiert und welche Folgen die *in vitro*-Übertragung von *penA*-Allelen von *N. lactamica* auf *N. meningitidis* auf die Penicillinempfindlichkeit der entstandenen Isolate hat.

Hierzu wurden 123 *N. lactamica*-Stämme und 129 *N. meningitidis*-Stämme phänotypisch und genotypisch untersucht. Zudem wurden Transformationsexperimente durchgeführt, in denen ein *in vivo*-Transfer von *N. lactamica*-DNA auf penicillinsensible Meningokokkenstämme simuliert wurde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Automatikpipetten</b>	<i>Gilson</i> (Middleton, USA), <i>Eppendorf</i> (Wesseling-Berzdorf)
<b>Brutschrank (BB 6220)</b>	<i>Heraeus</i> (Hanau)
<b>DNA-Sequencer (ABI Prism 3130)</b>	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, USA)
<b>Elektrophoresekammer für Agarosegele</b>	<i>BioRad</i> (Hercules, USA), <i>MWG Biotech</i> (Ebersberg)
<b>Elektroporationsgerät (Gene Pulser™)</b>	<i>BioRad</i> (Hercules, USA)
<b>Feinwaage (R 160 P)</b>	<i>Sartorius</i> (Göttingen)
<b>Geldokumentationsanlage (UVT 28 MP)</b>	<i>Herolab</i> (Wiesloch)
<b>Kühlschrank (Comfort NoFrost)</b>	<i>Liebherr</i> (Bulle, Schweiz)
<b>Kühlzentrifugen (RC5B und RC5B Plus)</b>	<i>Sorvall</i> (Waltham, USA)
<b>Magnetrührer (IKAMAG® RH)</b>	<i>Janke und Kunkel</i> (Staufen)
<b>Mikrowelle (MWS 1820 Duo)</b>	<i>Bauknecht</i> (Stuttgart)
<b>Photometer (U-2000)</b>	<i>Hitachi</i> (Tokio, Japan)
<b>Photometer (Vitek-Densicheck)</b>	<i>bioMérieux</i> (Marcy l'Etoile, Frankreich)
<b>Schüttelinkubator (Innova 4300)</b>	<i>New Brunswick Scientific</i> (Edison, USA)
<b>Spannungsgeräte (Standard Power Pack P25)</b>	<i>Biometra</i> (Göttingen)
<b>Spektrophotometer NanoDrop 1000</b>	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc.</i> (Waltham, USA)
<b>Thermoblock Thermomixer 5436</b>	<i>Eppendorf</i> (Wesseling-Berzdorf)
<b>Thermocycler (Primus 96plus)</b>	<i>MWG Biotech</i> (Ebersberg)
<b>Thermocycler (TRIO-Thermoblock™)</b>	<i>Biometra</i> (Hercules, USA)
<b>Tischzentrifuge (Biofuge 15)</b>	<i>Heraeus</i> (Hanau)
<b>Vortexer (Vortex Genie 2)</b>	<i>Scientific Industries</i> (Bohemia, USA)



<b>Vortexer (Mixer)</b>	<i>Hartenstein</i> (Würzburg)
<b>Vortexer (Reax 200)</b>	<i>Heidolph</i> (Schwabach)
<b>Waagen</b>	<i>Mettler</i> (Gießen)
<b>Wasserbad (SW20)</b>	<i>Julabo</i> (Seelbach)
<b>Zellaufschluss (Fast Prep 120)</b>	<i>ThermoSavant</i> (Waltham, USA)
<b>Zentrifuge (Megafuge 1.0)</b>	<i>Heraeus</i> (Hanau)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Elektroportationsküvetten</b>	<i>Eurogentec</i> (Seraing, Belgien)
<b>RNase- und DNase-freie 1,5ml Reaktionsgefäße</b>	<i>Ambion, Inc. RNA Company</i> (Austin, USA)
<b>15ml und 50 ml BD Falcon™ Röhren</b>	<i>Becton Dickinson</i> (Heidelberg)
<b>12ml sterile Plastikröhren</b>	<i>Greiner Labortechnik</i> (Essen)
<b>5ml sterile Röhren</b>	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht)
<b>0,5ml, 1,5ml und 2 ml Reaktionsgefäße</b>	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht)
<b>Spritzen und Kanülen, steril</b>	<i>Braun Melsungen AG</i> (Melsungen)
<b>13mm Puradisc™ Spritzenfilter</b>	<i>Whatman</i> (Clifton, USA)
<b>Wattetupfer</b>	<i>Greiner Labortechnik</i> (Essen)
<b>Holzzahnstocher</b>	<i>Kögler GmbH</i> (Twistringen)
<b>Parafilm</b>	<i>Pechiney Plastic Packaging</i> (Chicago, USA)
<b>Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)</b>	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht)

## 2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Etest®-Streifen</b>	<i>bioMérieux</i> (Marcy l'Etoile, Frankreich)
<b>5xSequenzpuffer</b>	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, USA)
<b>BBL™ Dryslide™ Nitrocefin</b>	<i>Becton, Dickinson and Co.</i> (Sparks, USA)
<b>Proteose-Pepton</b>	<i>Becton, Dickinson and Co.</i> (Sparks, USA)

<b>PolyViteX</b>	<i>bioMérieux</i> (Marcy l'Etoile, Frankreich)
<b>dNTPs, lyophilisiert</b>	<i>Carl Roth GmbH</i> (Karlsruhe)
<b>Proteinase K</b>	<i>Carl Roth GmbH</i> (Karlsruhe)
<b>Smart-Ladder</b>	<i>Eurogentec</i> (Seraign, Belgien)
<b>Ethidiumbromidlösung (2µg/ml)</b>	<i>Merck-Schuchart</i> (Darmstadt)
<b>Lysozym</b>	<i>Merck-Schuchart</i> (Darmstadt)
<b>Restriktionsenzyme</b>	<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)
<b>DNA modifizierende Enzyme</b>	<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)
<b>Taq-Polymerase</b>	<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)
<b>T4 DNA Ligase</b>	<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)
<b>Qiagen Genomic-tip 100/G</b>	<i>Qiagen</i> (Hilden)
<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	<i>Qiagen</i> (Hilden)
<b>QIAquick PCR Purification Kit</b>	<i>Qiagen</i> (Hilden)
<b>RNase</b>	<i>Qiagen</i> (Hilden)
<b>AmpliTaq®</b>	<i>Perkin Elmer</i> (Weiterstadt)
<b>Penicillin G</b>	<i>Sigma-Aldrich Chemie</i> (Steinheim)

## 2.4 Puffer und Lösungen

<b>Puffer oder Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b>1xTBE</b>	100mM Tris-HCl 100mM Borsäure 2,5mM EDTA pH 8,3
<b>GEBS:</b>	20% Glycerin 50mM EDTA 0,05% Bromphenolblau 0,5% N-Lauroylsarkosin
<b>Puffer B1</b>	50mM Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O 50mM Tris 0,5% Tween 20 0,5% Triton X-100

	pH 8,0
<b>Puffer B2</b>	3M Guanidin-HCl 20% Tween 20
<b>TE (10/1)</b>	10mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM EDTA (pH 8,0)

## 2.5 Bakterienkultivierung

### 2.5.1 Nährmedien

<b>Nährmedium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Proteose-Pepton-Medium (PPM)</b>	1,5% Proteose-Pepton 0,5% NaCl 0,05% Stärke 0,4% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit KOH auf pH 7,5 eingestellt
<b>PPM+ (supplementiert)</b>	49ml PPM 250µl 2 M MgCl <sub>2</sub> 250µl 8,4% NaHCO <sub>3</sub> 500µl PolyViteX
<b>LB-Medium</b>	1% Baktotrypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1,5% Bacto-Agar (bei Agarplatten)
<b>SOB-Medium</b>	2% Baktotrypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl
<b>SOC- Medium</b>	SOB-Medium 20mM Glucose 10mM MgCl <sub>2</sub> 10mM MgSO <sub>4</sub>

### 2.5.2 Agarplatten

Agarplatte	Hersteller
Columbia Agar	<i>bioMérieux</i> (Marcy l'Etoile, Frankreich)
GC Agar	Pulver von <i>Becton, Dickinson and Co.</i> (Sparks, USA), versetzt mit PolyViteX von <i>bioMérieux</i> (Marcy l'Etoile, Frankreich)
Martin-Lewis Agar	<i>Becton, Dickinson and Co.</i> (Sparks, USA)
Müller-Hinton Agar (mit 5% Schafblut)	<i>Becton, Dickinson and Co.</i> (Sparks, USA)

### 2.5.3 Wachstumsbedingungen

Alle Standardkultivierungen für Neisserien fanden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. *E.coli*-Stämme wurden bei 37°C inkubiert.

### 2.6 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von *Sigma-Aldrich Chemie* (Steinheim) bezogen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Primer, die für die Analyse des für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierenden Abschnitts des *penA*-Gens verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Annealingtemperatur
pen-AA-1	ATCGAACAGGCGACGATGTC	58°C
pen-99-2	GATTAAGACGGTGTGTTTTCACGG	60°C

## **2.7 Ablauf der phänotypischen und genotypischen Analyse sowie hierfür verwendete Bakterienstämme**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 123 *N. lactamica*-Stämme und 129 invasive Meningokokkenstämme zunächst phänotypisch und dann genotypisch auf ihr Resistenzverhalten gegenüber Penicillin G überprüft. Die verwendeten 123 *N. lactamica*-Stämme entstammen der bayerischen Meningokokkenträgerstudie und stellen eine repräsentative Zufallsauswahl aus dem Gesamtkollektiv von 287 Stämmen dar (Alber *et al.*, 2001). Sie sind im Anhang mit den zu ihnen gehörenden Charakteristika aufgeführt (Kapitel 7.1). Ebenfalls sind die für den phänotypischen und genotypischen Vergleich herangezogenen 129 *N. meningitidis*-Stämme im Anhang verzeichnet (Kapitel 7.2). Sie repräsentieren eine Zufallsstichprobe aus allen 461 Stämmen, die im Jahr 2006 am Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken (NRZM) eingegangen sind. Neben der primären, das Resistenzverhalten der beiden Spezies vergleichenden Analyse wurden auch sekundäre Analysen innerhalb der *N. lactamica*-Stämme durchgeführt. Hierfür wurden Informationen über Alter und Geschlecht der Bakterienträger sowie Stadt und Institution, in der die Stämme von den Trägern isoliert werden konnten, herangezogen. Bakterienstämme, die fehlende Werte für die betreffenden Variablen aufwiesen, wurden von der jeweiligen Analyse ausgeschlossen. Primäres Outcome aller durchgeführten Untersuchungen war die Empfindlichkeit gegenüber Penicillin G, welche als sogenannte MIC (*Minimum inhibitory concentration*) im Rahmen eines phänotypischen Testverfahrens festgestellt wurde.

## **2.8 Phänotypische Testverfahren**

### **2.8.1 Resistenztestung mittels Etest**

Über Nacht auf GC-Agar gewachsene Bakterien wurden in 2ml steriles 0,9%iges NaCl eingerieben. Die optische Dichte dieser Suspension wurde mit einem Vitek-Densicheck-Gerät gemessen und auf 0,5 der McFarland-Einheit eingestellt. Mittels eines gut benetzten sterilen Wattetupfers wurde die Suspension so auf Müller-Hinton-Agar mit 5% Schafblut ausgestrichen, dass die gesamte Fläche gleichmäßig mit Bakteriensuspension bedeckt war. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pinzette ein Etest-Streifen blasenfrei in der Mitte der Agarplatte aufgelegt. Nach Inkubation im

Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) für 18 bis 24 Stunden wurde das Ergebnis am Etest-Streifen abgelesen und die kleinste Konzentration, die kein sichtbares Wachstum aufwies, als MIC (*Minimum inhibitory concentration*) definiert.

Der Meningokokkenstamm  $\alpha$ 14 (MIC = 0,047  $\mu$ g/ml) wurde als Kontrolle mitgeführt.

### **2.8.2 Definition von Sensibilität, intermediärer Resistenz und Resistenz gegenüber Penicillin G**

Die Einteilung von *N. meningitidis*-Stämmen in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ gegenüber Penicillin anhand von MIC-Werten wird seit Jahren kontrovers diskutiert (Brown *et al.*, 2010; Taha *et al.*, 2007; Vazquez, 2001; Vazquez, 2007; Vazquez *et al.*, 2007). Folgerichtig finden sich in der Literatur verschiedene Breakpoints, die nebeneinander verwendet werden. Im Rahmen dieser Studie erfolgte sowohl für *N. meningitidis* als auch für *N. lactamica* die Eingruppierung der MIC-Werte nach den Standards des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) für die Anwendung von mit Penicillin versetzten Etest-Streifen bei *N. meningitidis*:

*sensibel (S): MIC  $\leq$  0,06  $\mu$ g/ml*

*intermediär resistent (I): 0,06  $\mu$ g/ml < MIC < 0,5  $\mu$ g/ml*

*resistent (R): MIC  $\geq$  0,5  $\mu$ g/ml*

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007).

Der mittels Etest ermittelte MIC-Wert von 0,064  $\mu$ g/ml wurde dem internationalen Konsensus entsprechend als sensibel eingestuft (Taha *et al.*, 2007; Vazquez *et al.*, 2007).

### **2.8.3 Test auf $\beta$ -Lactamase-Produktion**

$\beta$ -Lactamase-positive Meningokokken kommen im klinischen Alltag nur sehr selten vor (Vazquez, 2001). Dennoch wurden die mittels Etest als resistent gegenüber Penicillin G eingestuften *N. lactamica*-Stämme durch den BBL<sup>TM</sup> Dryslide<sup>TM</sup> Nitrocefing-Teststreifen auf ihre  $\beta$ -Lactamase-Produktion überprüft. Der Test wurde entsprechend den Angaben

des Herstellers durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der *N. gonorrhoeae*-Stamm mit der Stammnummer WUE3679.

## 2.9 Genotypische Testverfahren

### 2.9.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente. Hierzu bedient man sich der thermostabilen DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) und zweier spezifischer Oligonukleotide. Diese Oligonukleotide werden Primer genannt und so gewählt, dass sie - antiparallel an beiden Strängen der DNA hybridisierend - den festgelegten DNA-Abschnitt umschließen. Somit kann dieser vervielfältigt werden.

Die PCR selbst wird in einem Thermocycler durchgeführt und beinhaltet nacheinander die Denaturierung der DNA, die Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge (Annealing) und die Polymerasereaktion selbst.

Folgendes Ablaufschema wurde bei allen Versuchen dieser Arbeit angewandt:

1.	Denaturierung	300 – 600 sec	bei 94°C
2.	Annealing	60 sec	bei Annealing-Temperatur
3.	Polymerasereaktion	x sec	bei 72°C
4.	Denaturierung	60 sec	bei 94°C
5.	Annealing	60 sec	bei Annealing-Temperatur
6.	Polymerasereaktion	600 sec	bei 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden dabei in 36 Zyklen durchlaufen.

Die Temperatur während der Polymerasereaktion (Extension) wird entsprechend dem Temperaturoptimum der verwendeten Taq-DNA-Polymerase gewählt. Somit sind die Dauer der Polymerasereaktion (Extension-Zeit) und die Annealing-Temperatur die einzigen Variablen im Ablaufplan. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und wird 4°C niedriger als jene gewählt. Zur

Berechnung der Schmelztemperatur der Primer wird die 2+4 Regel herangezogen, welche den Zusammenhang

$$T_m = n \times (G + C) \times 4^\circ\text{C} + n \times (T + A) \times 2^\circ\text{C}$$

herstellt, wobei  $n \times (G + C)$  bzw.  $n \times (T + A)$  für die Häufigkeit der jeweiligen Nukleotide (Guanidin und Cytidin, bzw. Thymin und Adenosin) in den Primersequenzen steht. Die Extension-Zeit wird an die Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst, wobei davon auszugehen ist, dass in 60 Sekunden ungefähr 1000 Nukleotide eingebaut werden können.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten *penA*-PCR mit den Primern pen-AA-1 und pen-99-2 ergaben sich eine Annealing-Temperatur von 58°C und eine Extension-Zeit von 30sec. Es wurde hierbei folgendes Schema für den Reaktionsansatz (100µl) verwendet:

1	µl	Bakteriensuspension
10	µl	10xPCR-Puffer (NEB-Puffer)
10	µl	dNTP (jeweils 2mM)
1	µl	Primer 1 (20µM)
1	µl	Primer 2 (20µM)
0,4	µl	Taq-DNA-Polymerase (NEB-Taq, 5U/µl)
76,6	µl	ddH <sub>2</sub> O

### 2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Fragmente wurde 1,5%ige (für 0,2 – 3kb) oder 0,8%ige Agarose (für 0,8 – 12kb) in den jeweiligen Gelen eingesetzt. Die sich aus der Konzentration ergebende Agarosemenge wurde in 1xTBE eingerührt, unter Hitzezufuhr mittels Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen in die jeweilige Gelkammer gegossen. Zu analysierende Proben wurden mit GEBS (farbiger Marker, der die Lauffront markiert) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente - wenn nicht anders beschrieben - Smart-Ladder. Bei Raumtemperatur wurde an die Elektrophoresekammer



eine Spannung von 200V für einen von der Größe der zu untersuchenden Fragmente abhängigen Zeitraum angelegt.

Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel für 10 – 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gelegt und anschließend unter einer UV-Lampe bei 230nm Wellenlänge betrachtet. Im Vergleich mit dem benutzten Marker konnten sowohl die Größe als auch die Menge der zu analysierenden Proben bestimmt werden.

### **2.9.3 Bestimmung der DNA-Menge**

Zur Bestimmung der DNA-Menge wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Zum einen konnte die DNA-Menge im Rahmen der Gelelektrophorese im Vergleich gegen den benutzten Marker (Smart-Ladder), dessen DNA-Mengen pro Bande bekannt waren, abgeschätzt werden.

Des Weiteren wurde eine spektrophotometrische Messung bei 260nm mit dem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.9.4 DNA-Aufreinigung**

Die PCR-Produkte wurden (nach Kontrolle mittels Gelelektrophorese) mit dem QIAquick PCR Purification Kit den Angaben des Herstellers entsprechend aufgereinigt.

### **2.9.5 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in dieser Arbeit basierte auf der „Kettenabbruch“-Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung von BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Sequenzieransatz enthielt als Template PCR-Fragmente (100ng) oder Plasmid-DNA (400ng), 10pmol des jeweiligen Sequenzierprimers sowie 2µl 5xSequenzierpuffer. Schließlich wurde der Sequenzieransatz mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 9µl aufgefüllt. Die Sequenzierung auf dem ABI Prism<sup>TM</sup> 3130 DNA-Sequenzierautomat (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde im Bereich Molekularbiologie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität

Würzburg durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Datei in verschiedenen Formaten bereitgestellt.

### **2.9.6 Sequenzanalyse und *penA*-Datenbank**

Für das *penA*-Gen wurde ein Alignment der erhaltenen DNA-Sequenzen mit Hilfe des Programms Ridom TraceEditPro ([www.ridom.de/traceedit](http://www.ridom.de/traceedit)) durchgeführt (Vergleichsallel: *penA1*). Anschließend fand ein Sequenzvergleich mit den Allelen statt, die in der *penA*-Datenbank (<http://pubmlst.org/neisseria>) hinterlegt sind. Durch Eingabe einer Sequenz im FASTA-Format kann man die ermittelte Sequenz mit allen in der Datenbank hinterlegten Allelen vergleichen und erhält als Ergebnis das der eingegebenen Sequenz ähnlichste Allel und gegebenenfalls die dazu gehörenden Sequenzunterschiede. Neben den Sequenzen der Allele sind auch weitere Informationen zu den Trägern und den Isolaten selbst hinterlegt. Außerdem ist es möglich für jedes Allel die schon beschriebenen fünf spezifischen Polymorphismen zu betrachten. Im Rahmen dieser Studie neu aufgetretene, in der Datenbank nicht vorhandene Allele wurden mit einem vorläufigen Namen belegt und dem Kurator der *penA*-Datenbank zur Qualitätskontrolle und zur Vergabe einer neuen Allelnummer zugestellt.

### **2.9.7 Phylogenetische Analyse**

Die *penA*-Allele der in dieser Arbeit analysierten *N. lactamica*-Stämme wurden sowohl zusammen mit den *penA*-Allelen der Meningokokkenvergleichsgruppe als auch mit allen in der *penA*-Datenbank vorhandenen Allelen phylogenetisch untersucht.

Hierfür wurden zwei Programme herangezogen, die auf unterschiedliche Methoden zurückgreifen. Mit der Open Source Software Jalview ([www.jalview.org](http://www.jalview.org)) wurde eine *split decomposition* Analyse durchgeführt (Huson & Bryant, 2006). Die mit SplitsTree4 ([www.splitstree.org](http://www.splitstree.org)) erarbeitete phylogenetische Analyse basierte hingegen auf einem *neighbour joining tree* (Huson, 1998). Hierbei fand ein Alignment der *penA*-Nukleotidsequenzen mit ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) statt.

## 2.10 Genetische Transformation von Neisserien

### 2.10.1 Isolation chromosomaler DNA

Über Nacht gewachsene Bakterien von zwei GC-Agarplatten wurden in 5ml 1xPBS eingerieben. Von dieser Suspension wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt.  $1,5 \times 10^{10}$  Zellen wurden für die DNA-Isolation verwendet, wobei 1ml Zellsuspension mit OD<sub>600</sub>= 1,0 etwa  $1 \times 10^9$  Zellen entspricht. Die Bakteriensuspension wurde für 10min bei 4000rpm zentrifugiert. Die chromosomale DNA wurde mit dem Qiagen Genomic-tip 100/G Kit den Herstellerangaben entsprechend isoliert.

Das DNA-Pellet wurde bei 37°C für 10min luftgetrocknet und anschließend in 100µl TE über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Anschließend wurde die Suspension durch einen 13mm Puradisc™ Spritzenfilter von möglichen Verunreinigungen gesäubert. Die Menge und die Qualität der DNA wurde mittels Messung der OD<sub>260</sub> bestimmt.

### 2.10.2 Transformation von Meningokokken

Meningokokken gehören zu den natürlich kompetenten Bakterienspezies. Sie können DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen und ins eigene Genom integrieren. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein homologer Bereiche, welches sich in sogenannten *DNA-uptake-Sequenzen* (DUS) widerspiegelt (Davidsen *et al.*, 2004; Hanage *et al.*, 2005; Hanage *et al.*, 2006; Maiden, 2008; Treangen *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Fähigkeit sind sie nicht nur dazu in der Lage in Plasmiden verpackte Gene aufzunehmen, sondern auch homologe DNA-Abschnitte mit anderen Bakterien bzw. deren chromosomaler DNA auszutauschen.

Meningokokken wurden ÜN auf GC-Agar bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) angezogen und mit einem sterilen Wattetupfer in 5ml PPM<sup>+</sup> eingerieben. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 0,2 eingestellt. Die Bakterien wurden für 1h bei 37°C und 200rpm inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf OD<sub>600</sub>= 0,1 verdünnt und zu 1ml Bakteriensuspension wurde eine Gesamtmenge von 2µg chromosomaler DNA (minimale Einzelmenge: 0,5µg) hinzugefügt (Faruki & Sparling, 1986; Francis *et al.*, 2000). Die Transformationsansätze wurden für 5 bis 6 Stunden erneut bei 37°C und 200rpm inkubiert. Danach wurden die Bakterien im Röhrchen abzentrifugiert (400rpm, 15min)

und der entstandene Überstand wurde bis auf 100µl verworfen. Das zurückgebliebene Pellet wurde im verbliebenen Flüssigkeitsrest resuspendiert und anschließend auf Penicillin G-haltigem GC-Agar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert und am nächsten Tag analysiert.

### 2.10.3 Ablauf der Transformationsexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transformationsexperimente durchgeführt, bei denen der sensible Meningokokkenstamm  $\alpha 14$  als Rezipient (aufnehmender Stamm) mit Mischungen der chromosomalen DNA von jeweils vier Stämmen transformiert wurde. Diese Experimente wurden für verschiedene Gruppen von *N. lactamica*- und *N. meningitidis*-Stämmen durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Transformationen des Rezipientenstammes mit seiner eigenen DNA dienten als Kontrolle. Die Transformationsexperimente wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Transformation des Rezipientenstammes mit Mischungen der chromosomalen DNA von jeweils vier Stämmen (2µg/ml),
2. Selektion mittels GC-Agarplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Penicillin G (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,2 µg/ml, 1,4 µg/ml),
3. Phänotypische Analyse (Penicillin-Etest) und genotypische Analyse (PCR, Sequenzierung, Sequenzanalyse) von fünf Einzelkolonien der Platte, die bei höchster Penicillinkonzentration noch bakterielles Wachstum zeigte,
4. Verwendung der Transformanten aus Schritt 3 als neue Rezipienten für Schritt 1.

Der Zyklus wurde dreimal durchlaufen, so dass insgesamt drei aufeinanderfolgende Transformationen pro Experiment durchgeführt wurden.

Eine Übersicht über die für die Transformationen verwendeten Bakterienstämme wird in Tabelle 7 gegeben. Die bei den Transformationsversuchen eingesetzten Meningokokkenstämme sind mit ihren phänotypischen und genotypischen Eigenschaften in Kapitel 7.3 dargestellt. Nähere Informationen zu den verwendeten *N. lactamica*-Stämmen sind Kapitel 7.1 zu entnehmen.

## 2.11 Statistische Analyse

Alle statistischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) oder der Open Source Software R 2.10.0 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) durchgeführt (R Development Core Team, 2010). Für deskriptive Analysen wurde Microsoft Excel 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) verwendet. Aufgrund der Verteilung der Outcomevariablen wurde auf nicht-parametrische Testverfahren zurückgegriffen. Für den Vergleich von MIC-Werten in zwei unabhängigen Gruppen wurden Wilcoxon-Rangsummentests verwendet. Um die MIC-Werte von mehr als zwei Gruppen (Herkunftsorte, Institutionen) vergleichen zu können, wurde auf Kruskal-Wallis-Tests zurückgegriffen. Bei einem signifikanten Ergebnis des globalen Tests wurden anschließend paarweise Wilcoxon-Rangsummentests mit Bonferroni-Korrektur als nicht-parametrische Post-hoc-Tests durchgeführt (Dunn-Procedure). Bei der Beziehung MIC-Wert zu Alter des Trägers wurde auf ein lineares Regressionsmodell zurückgegriffen, wobei die MIC-Werte als Zielvariable logarithmiert wurden (Brown *et al.*, 2010; Turnidge *et al.*, 2006). Für Korrelationen zwischen quantitativen Variablen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient herangezogen. Waren eine oder beide Variablen qualitativ, so wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 verwendet.

## 2.12 Verwendete Computerprogramme

Programm	Hersteller
<b>BioEdit 5.0</b>	Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA
<b>ClustalW</b>	The European Bioinformatics Institute, Hinxton, Großbritannien
<b>Jalview 2.0</b>	University of Dundee, Dundee, Großbritannien (Waterhouse <i>et al.</i> , 2009)
<b>MEGA4</b>	Center for Evolutionary Medicine and Informatics, Tempe, USA (Tamura <i>et al.</i> , 2007)
<b>MS Excel 2007</b>	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
<b>MS Word 2007</b>	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
<b>Ridom TraceEditPro</b>	Ridom GmbH, Würzburg
<b>R</b>	R Development Core Team (R Development Core Team, 2010)
<b>SPSS 17.0</b>	SPSS Inc., Chicago, USA
<b>SplitsTree 4.10</b>	Universität Tübingen, Tübingen (Huson & Bryant, 2006)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypische Analyse

Insgesamt wurden in dieser Studie 129 invasive Meningokokkenstämme und 123 *N. lactamica*-Stämme mittels Etest-Streifen auf ihre Sensibilität gegenüber Penicillin untersucht.

##### 3.1.1 Ergebnisse der Resistenztestung

107 (83,0%) der 129 untersuchten Meningokokkenstämme konnten als sensibel eingestuft werden, die restlichen 22 (17,0%) als intermediär resistent. Es konnten keine penicillinresistenten Isolate nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Bei den *N. lactamica*-Stämmen zeigte sich ein anderes Bild. Nur drei Stämme wurden als sensibel gegenüber Penicillin eingestuft. 36,6% (n=45) der untersuchten Isolate waren sogar resistent (Tabelle 2).

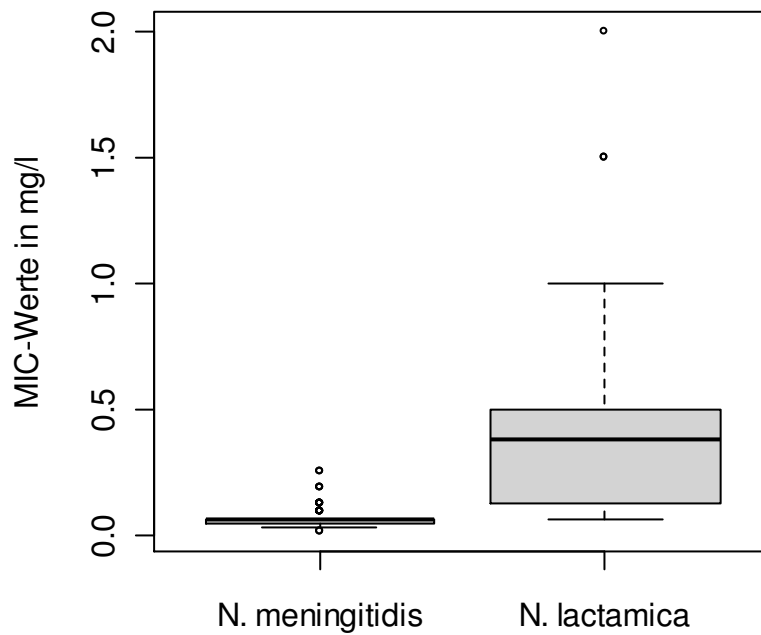
**Tabelle 2:** Etest-Ergebnisse bei *N. meningitidis* und *N. lactamica*.

	<i>N. meningitidis</i> (n=129)	<i>N. lactamica</i> (n=123)
<b>MIC (µg/ml)</b>		
<i>Spannweite</i>	0,016-0,25	0,064-2,0
<i>Median</i>	0,064	0,38
<i>90%-Quantil</i>	0,094	0,75
<i>75%-Quantil</i>	0,064	0,5
<i>25%-Quantil</i>	0,047	0,125
<b>Anzahl der Isolate</b>		
<i>sensibel<sup>a</sup></i>	107	3
<i>intermediär</i>	22	75
<i>resistent</i>	0	45

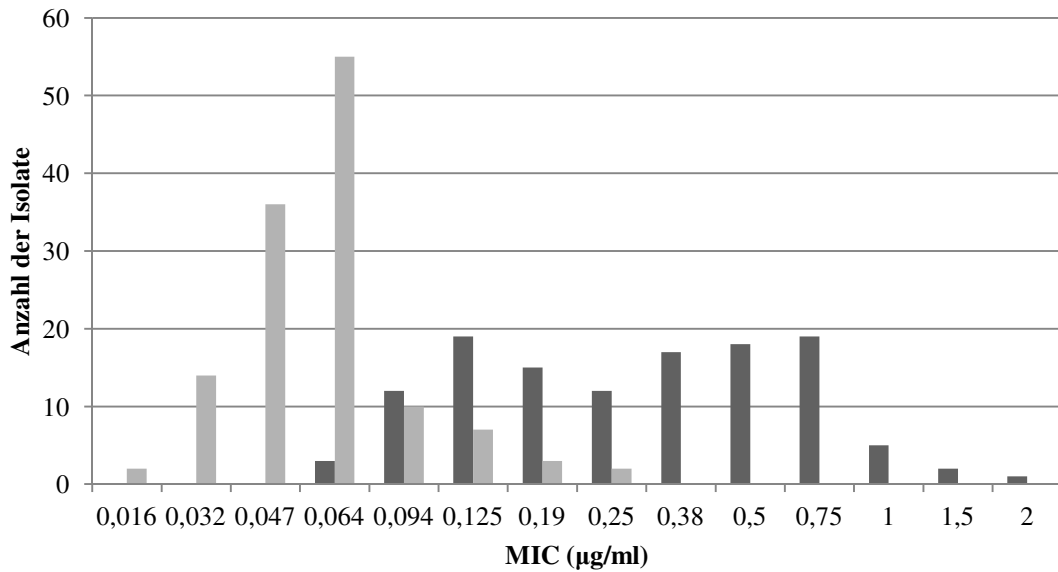
<sup>a</sup> sensibel (S): MIC ≤ 0,06 (einschließlich 0,064); intermediär (I): 0,064 < MIC < 0,5; resistent (R): MIC ≥ 0,5 (Interpretation nach CLSI Standards und Übereinkunft der EMGM)

Mit Hilfe eines Wilcoxon-Rangsummentests konnte nachgewiesen werden, dass die MIC-Werte der in dieser Studie beobachteten *N. lactamica*-Stämme signifikant höher waren als die der *N. meningitidis*-Stämme (p < 0,001, Abb. 3, 4).

- Ergebnisse -



**Abb. 3:** Boxplots der MIC-Werte von *N. meningitidis* (n=129) und *N. lactamica* (n=123), bestimmt mittels Penicillin G Etest.



**Abb. 4:** MIC-Werte bei *N. lactamica* (hellgraue Balken, n=123) und *N. meningitidis* (dunkelgraue Balken, n=129), bestimmt mittels Penicillin G Etest.

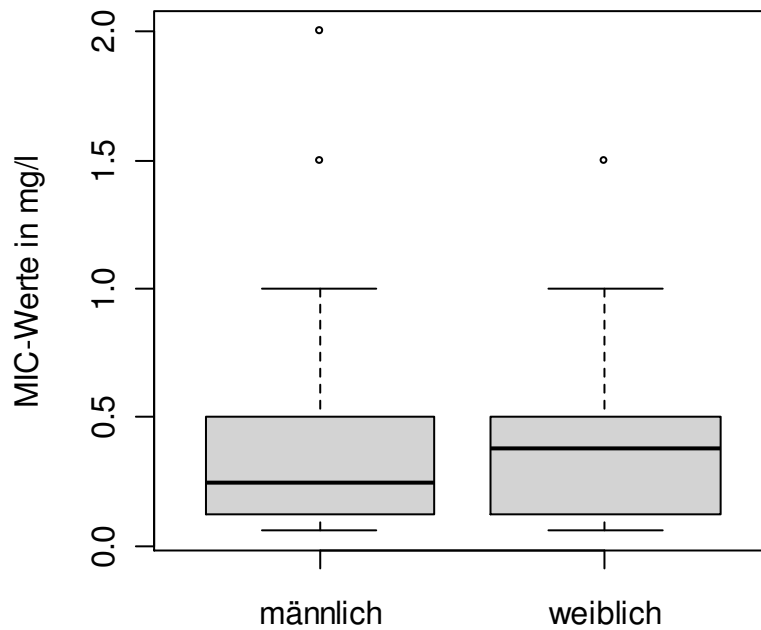
Auffällig bei der Verteilung der MIC-Werte von *N. lactamica* ist der bimodale Verlauf, welcher gegen eine eigentlich zu erwartende Normalverteilung spricht (Abb. 4).



### 3.1.2 Untersuchungen innerhalb der Spezies *N. lactamica*

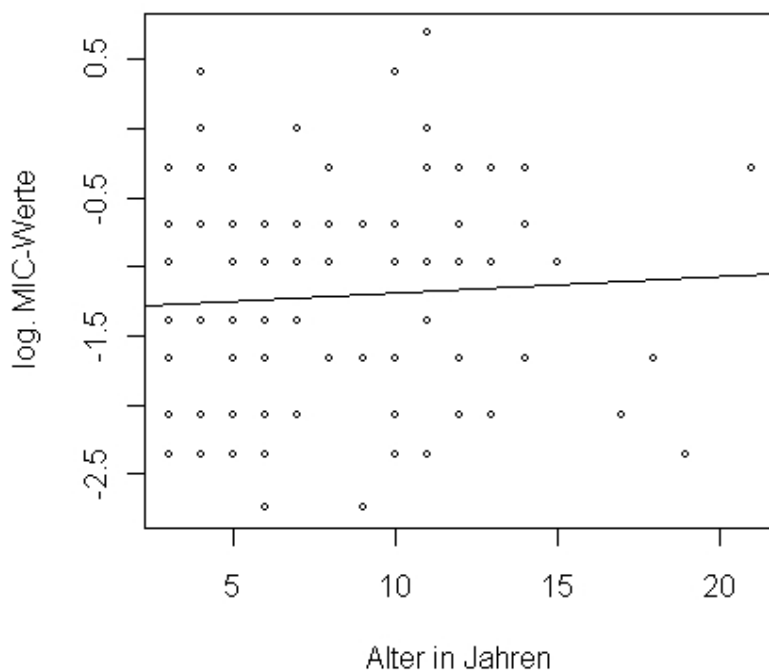
Im Rahmen der bayerischen Meningokokkenträgerstudie fand zusätzlich zur Materialsammlung bei Abgabe der Probe auch eine Datenerhebung statt (Alber *et al.*, 2001). Hierbei wurden neben Alter und Geschlecht der *N. lactamica*-Träger zusätzlich auch Ort und Art der Institution, in der die Probe erhoben wurde, vermerkt. Mit Hilfe dieser Informationen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den bekannten äußeren Faktoren der *N. lactamica*-Träger und den ermittelten MIC-Werten bestand.

Es ließ sich nachweisen, dass kein Zusammenhang zwischen den ermittelten MIC-Werten und dem Geschlecht der Träger bestand ( $p = 0,947$ , Wilcoxon-Rangsummentest, Abb. 5).



**Abb. 5:** Boxplots der MIC-Werte bei männlichen (n=60) und weiblichen (n=59) *N. lactamica*-Trägern. Für die Variable Geschlecht lagen vier fehlende Werte vor.

Mittels linearer Regression konnte gezeigt werden, dass ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den MIC-Werten und dem Alter der Träger bestand ( $p = 0,545$ , Abb. 6).



**Abb. 6:** Streudiagramm, das die logarithmierten MIC-Werte in Abhängigkeit vom Alter des *N. lactamica*-Trägers darstellt. Regressionsgerade:  $\log(\text{MIC}) = -1,310 + 0,012 \cdot \text{Alter in Jahren}$  ( $p = 0,545$ ,  $r^2 = 0,003$ ). Es lagen zwei fehlende Werte für die Variable Alter vor.

Betrachtet man die MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme in Abhängigkeit vom Ort, an dem sie isoliert werden konnten, so zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test ein globaler Unterschied zwischen den verschiedenen Städten ( $p = 0,006$ ). Mithilfe von Post-Hoc-Tests konnte ermittelt werden, dass sich nach Bonferroni-Korrektur ausschließlich Augsburg signifikant von zwei anderen Städten (Ansbach, Griesbach) unterschied (Tabelle 3). In Augsburg konnten auch die insgesamt höchsten MIC-Werte verzeichnet werden. Zwischen den übrigen Städten bestanden keine signifikanten Unterschiede (für alle Vergleiche siehe Kapitel 7.4). Dass sich zwischen Augsburg und anderen Städten trotz stark divergierender MIC-Werte keine signifikanten Unterschiede zeigten, ist auf die teilweise sehr niedrigen Fallzahlen an den jeweiligen Erhebungsorten zurückzuführen, welche auch eine deutliche Limitation der Aussagekraft der durchgeführten Untersuchung darstellen. Zudem wurden mit Bonferroni-korrigierten Wilcoxon-Rangsummentests sehr konservative Post-Hoc-Tests eingesetzt.

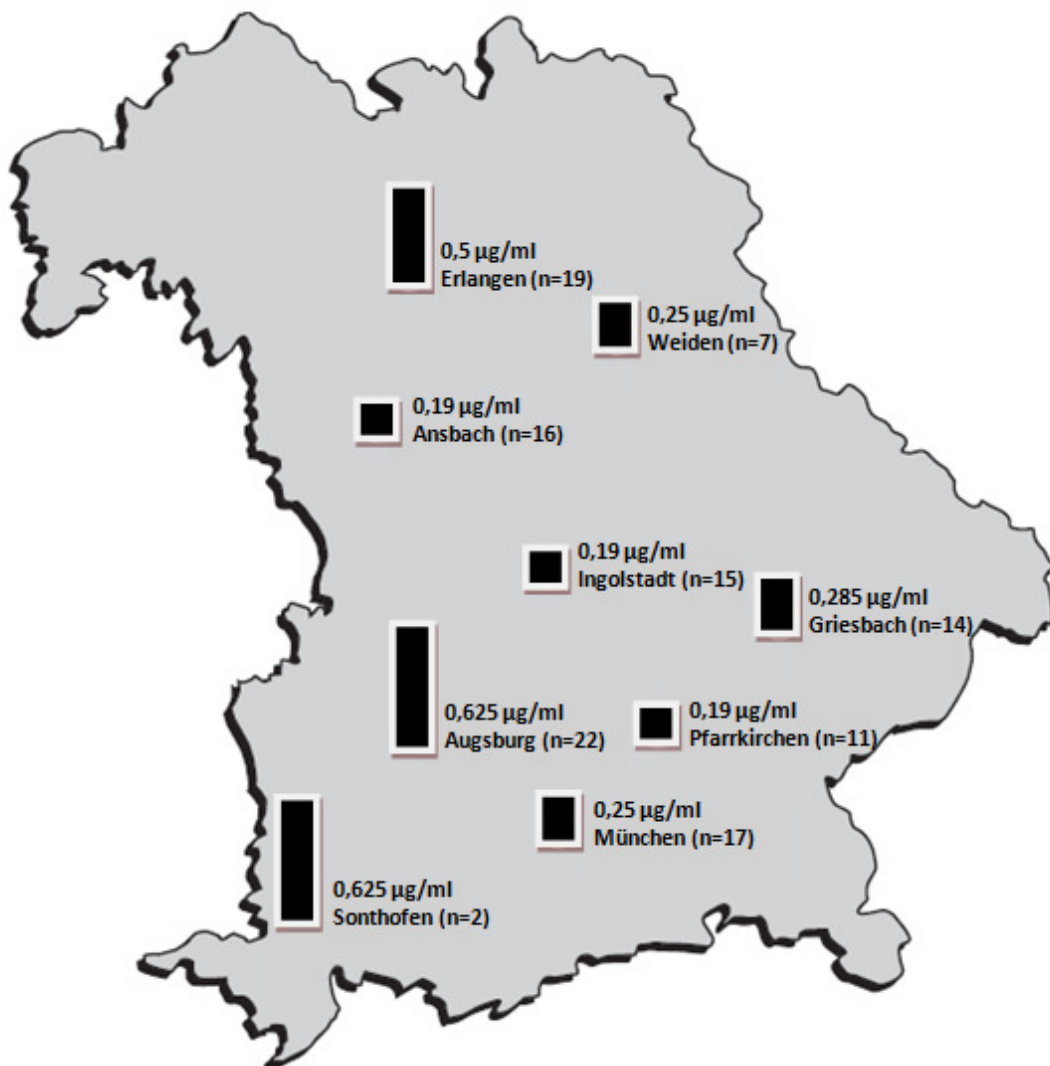
- Ergebnisse -

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Bonferroni-korrigierten Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich der MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme aus der Stadt Augsburg mit den MIC-Werten der *N. lactamica*-Stämme aus allen anderen Städten. Dargestellt sind der Median sowie der Interquartilsabstand der MIC-Werte in den jeweiligen Städten (in µg/ml).

Stadt	n	MIC-Median	IQR (Inter-quartilsabstand) <sup>a</sup>	p-Wert	Bonferroni-korrigierter p-Wert
<b>Augsburg</b>	22	0,625	0,38-0,75		
<b>Ansbach</b>	16	0,19	0,125-0,44	0,001	0,045
<b>Erlangen</b>	19	0,5	0,19-0,75	0,097	1,000
<b>Griesbach</b>	14	0,285	0,125-0,38	0,001	0,050
<b>Ingolstadt</b>	15	0,19	0,125-0,44	0,003	0,126
<b>München</b>	17	0,25	0,125-0,5	0,011	0,412
<b>Pfarrkirchen</b>	11	0,19	0,110-0,44	0,002	0,060
<b>Sonthofen</b>	2	0,625	0,25-1,0	0,950	1,000
<b>Weiden</b>	7	0,25	0,19-0,38	0,037	1,000

<sup>a</sup>Dargestellt sind das erste und dritte Quartil (25% und 75% Perzentile).

Aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen den MIC-Werten einiger Städte wurde eine genauere räumliche Betrachtung der MIC-Verteilung vorgenommen (Abb. 7). Mittels deskriptiver Verfahren konnte allerdings kein Hinweis auf eine räumliche Ursache der unterschiedlichen MIC-Werte gefunden werden. Weitergehende räumliche Analysen (z.B. im Rahmen einer Clusteranalyse) wurden deshalb nicht durchgeführt.



**Abb. 7:** Karte des Freistaates Bayern mit den Erhebungsorten der bayerischen Meningokokkenträgerstudie, an denen die *N. lactamica*-Stämme dieser Studie isoliert wurden (nach (Oberkötter, 2003)). Die Lage der Städte ist durch den Fußpunkt der zur jeweiligen Stadt gehörenden Balken definiert. Über dem Städtenamen ist der Median der MIC-Werte in dieser Stadt verzeichnet, dahinter die jeweilige Fallzahl. Die Höhe der Balken ist proportional zum Median der MIC-Werte.

Ein Kruskal-Wallis-Test im Hinblick auf die Institutionen, in denen die Proben gesammelt wurden, ergab global keine Differenzen ( $p = 0,341$ ). Verglichen wurden dabei die Kategorien Kindergarten ( $n=76$ ), Grundschule ( $n=31$ ) und weiterführende Schule ( $n=6$ ), in die die Institutionen Realschule ( $n=2$ ), Gymnasium ( $n=2$ ) und Fachoberschule ( $n=2$ ) zusammengefasst wurden. Die Ergebnisse fielen erwartungsgemäß aus, da aufgrund der hohen Korrelation zwischen Alter und Institution (Spearman-Korrelationskoeffizient  $r = 0,9$ ) entweder bei beiden Variablen oder bei keiner der Variablen ein Einfluss auf die MIC-Werte zu erwarten war.

### 3.2 Genotypische Analyse

Im Rahmen der genotypischen Analyse wurde der für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierende Abschnitt des *penA*-Gens aller 129 Meningokokkenstämme und 123 *N. lactamica*-Stämme dieser Studie untersucht. Hierbei wurde auf die zuvor beschriebene 402 Basenpaare umfassende PCR zurückgegriffen. Besonderes Augenmerk wurde auf die fünf Mutationen in der Transpeptidaseregion gelegt, welche mit einer herabgesetzten Penicillinsensibilität bei Meningokokken verbunden sind (Taha *et al.*, 2007).

#### 3.2.1 Ergebnisse der *penA*-Untersuchung bei *N. meningitidis*

Alle 129 Meningokokkentämme dieser Studie wiesen Allele auf, welche zuvor schon in die *penA*-Datenbank eingelesen und mit einer Allelnummer versehen worden waren (Kapitel 7.2). Bezogen auf die fünf spezifischen Punktmutationen im *penA*-Gen zeigte sich, dass 94,6% (n=122) der analysierten Stämme keine der beschriebenen Mutationen aufwiesen (im Folgenden als 0/5-Polymorphismus bezeichnet). 5,4% (n=7) der untersuchten Isolate besaßen hingegen die fünf Mutationen (im Folgenden als 5/5-Polymorphismus bezeichnet, Abb.8).

Polymorphismen im <i>penA</i> -Gen					Resistenzverhalten	Anzahl (n=129)
504 <sup>a</sup>	510	515	541	566		
F	A	I	H	I	sensibel	122
L	V	V	N	V	intermediär resistent	7

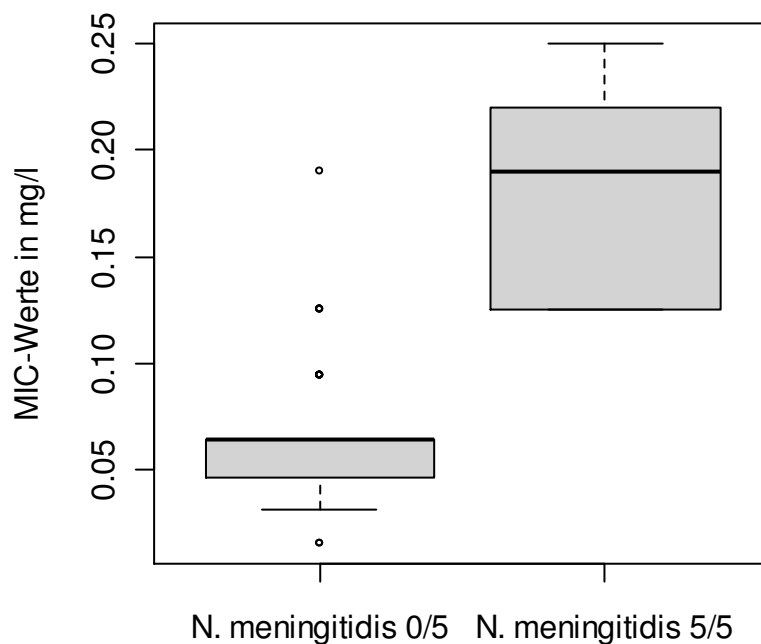
**Abb. 8:** *penA*-Polymorphismen bei *N. meningitidis*. Von oben nach unten sind 0/5 und 5/5-Polymorphismus (grau hinterlegt) zusammen mit dem jeweiligen Aminosäuremuster, den Häufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen bei den *N. meningitidis*-Stämmen dieser Studie sowie dem Resistenzverhalten gegenüber Penicillin dargestellt. Beteiligte Aminosäuren (Einbuchstabencode): Phenylalanin (F), Alanin (A), Isoleucin (I), Histidin (H), Leucin (L), Valin (V), Asparagin (N). <sup>a</sup>Position der betroffenen Aminosäuren im PBP2.

Kombiniert man die Ergebnisse der phänotypischen und der genotypischen Analyse, so zeigt sich, dass die Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel signifikant höhere MIC-Werte aufwiesen als die mit 0/5-Polymorphismus-Allel ( $p < 0,001$ , Tabelle 4, Abb. 9).

**Tabelle 4:** Etest-Ergebnisse für *N. meningitidis* in Abhängigkeit vom *penA*-Polymorphismus

	<i>N. meningitidis</i> 0/5 (n=122)	<i>N. meningitidis</i> 5/5 (n=7)
<b>MIC (µg/ml)</b>		
<i>Spannweite</i>	0,016-0,19	0,125-0,25
<i>Median</i>	0,064	0,19
<i>90%-Quantil</i>	0,094	0,25
<i>75%-Quantil</i>	0,064	0,22
<i>25%-Quantil</i>	0,047	0,125
<b>Anzahl der Isolate</b>		
<i>sensibel<sup>a</sup></i>	107	0
<i>intermediär</i>	15	7
<i>resistent</i>	0	0

<sup>a</sup> sensibel (S): MIC ≤ 0,06 (einschließlich 0,064); intermediär (I): 0,064 < MIC < 0,5; resistent (R): MIC ≥ 0,5 (Interpretation nach CLSI Standards und Übereinkunft der EMGM)



**Abb. 9:** Boxplots der MIC-Werte der *N. meningitidis*-Stämme mit 0/5-Polymorphismus (*N. meningitidis* 0/5, n=122) und der *N. meningitidis*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus (*N. meningitidis* 5/5, n=7).

### 3.2.3 Ergebnisse der *penA*-Untersuchung bei *N. lactamica*

Für die 123 untersuchten *N. lactamica*-Stämme dieser Studie konnten 60 verschiedene *penA*-Allele ermittelt werden. 51 der 60 Allele waren nicht in der *penA*-Datenbank vorhanden, was sich darauf zurückführen lässt, dass bis zum Beginn dieser Studie nur Allele in die Datenbank aufgenommen werden konnten, die aus Meningokokken isoliert worden waren. Den im Rahmen dieser Studie neu eingereichten 51 *penA*-Allelen wurden die Allelnummern 213 bis 263 der *penA*-Datenbank zugewiesen.

Betrachtet man die fünf für das Resistenzniveau von *N. meningitidis* entscheidenden Polymorphismen, so zeigt sich bei *N. lactamica* ein Bild, das von dem bei *N. meningitidis* abweicht.

Von den insgesamt 123 Stämmen wiesen nur zwei ein 0/5-Polymorphismus-Allel auf. Ein Stamm zeigte ein Allel, bei dem vier der fünf Mutationen (Stelle: 504, 510, 515, 566) vorhanden waren (im Folgenden als 4/5-Polymorphismus bezeichnet). Bei 64 Stämmen (52,0%) konnte ein Allel mit den beschriebenen fünf Mutationen nachgewiesen werden. Ein großer Teil der untersuchten Isolate (n=56, 45,5%) zeigte einen Genotyp, der bei Meningokokken bisher nicht beschrieben worden war und bei dem nur drei der fünf Mutationen vorhanden waren. Diese Mutationen betreffen die Aminosäuren 515, 541 und 566, der zugehörige Genotyp wird im Folgenden als 3/5-Polymorphismus bezeichnet (Abb. 10).

Polymorphismen im <i>penA</i> -Gen					Resistenzverhalten	Anzahl (n=123)
504 <sup>a</sup>	510	515	541	566		
F	A	I	H	I	intermediär resistent	2
F	A	V	N	V	sensibel/intermediär resistent	56
L	V	V	N	V	intermediär resistent/resistent	64

**Abb. 10:** *penA*-Polymorphismen bei *N. lactamica*. Von oben nach unten sind 0/5-, 3/5- und 5/5-Polymorphismus zusammen mit dem jeweiligen Aminosäuremuster, den Häufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen bei den *N. lactamica*-Stämmen dieser Studie sowie dem Resistenzverhalten gegenüber Penicillin dargestellt. Beteiligte Aminosäuren (Einbuchstabencode): Phenylalanin (F), Alanin (A), Isoleucin (I), Histidin (H), Leucin (L), Valin (V), Asparagin (N).

<sup>a</sup>Position der betroffenen Aminosäuren im PBP2.

Auch für die *N. lactamica*-Stämme dieser Studie wurde untersucht, ob und wie die verschiedenen *penA*-Polymorphismen mit den ermittelten MIC-Werten assoziiert sind

(Tabelle 6). Hierbei wurden die Stämme mit 0/5 bzw. 4/5-Polymorphismus-Allel aufgrund des seltenen Auftretens (n=2 bzw. n=1) nicht berücksichtigt. Mit Hilfe eines Wilcoxon-Rangsummentests konnte nachgewiesen werden, dass die MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel signifikant höher waren als die der Stämme mit 3/5-Polymorphismus-Allel (p-Wert < 0,001).

**Tabelle 5:** Etest-Ergebnisse für *N. lactamica* in Abhängigkeit vom *penA*-Polymorphismus.

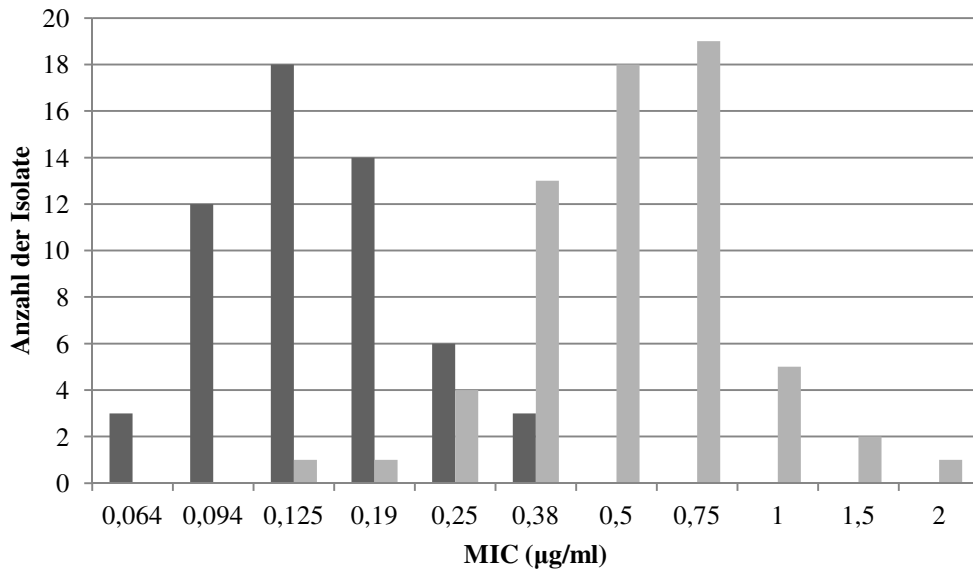
	<i>N. lactamica</i> 3/5 (n=56)	<i>N. lactamica</i> 5/5 (n=64)
<b>MIC (µg/ml)</b>		
<i>Spannweite</i>	0,064-0,38	0,125-2,0
<i>Median</i>	0,125	0,5
<i>90%-Quantil</i>	0,25	1,0
<i>75%-Quantil</i>	0,19	0,75
<i>25%-Quantil</i>	0,094	0,38
<b>Anzahl der Isolate</b>		
<i>sensibel<sup>a</sup></i>	3	0
<i>intermediär</i>	53	19
<i>resistent</i>	0	45

<sup>a</sup> sensibel (S): MIC ≤ 0,06 (einschließlich 0,064); intermediär (I): 0,064 < MIC < 0,5; resistent (R): MIC ≥ 0,5 (Interpretation nach CLSI Standards und Übereinkunft der EMGM)

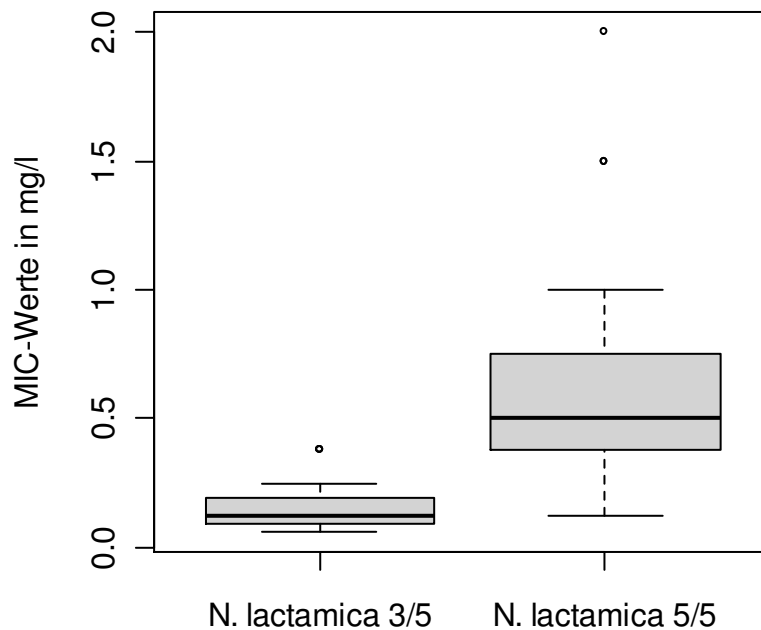
Anhand des Boxplots und des Säulendiagramms kann leicht nachvollzogen werden, dass beinahe eine scharfe Trennung der MIC-Werte zwischen der 3/5-Polymorphismus-Allel-Gruppe und der 5/5-Polymorphismus-Allel-Gruppe vorliegt (Abb. 11, Abb. 12). Durch die unterschiedlichen MIC-Werte in den beiden Gruppen kann auch die bimodale Verteilung der MIC-Werte bei *N. lactamica* erklärt werden.



- Ergebnisse -



**Abb. 11:** MIC-Werte bei *N. lactamica* (n=120). *N. lactamica*-Stämme mit 3/5-Polymorphismus (*N. lactamica* 3/5, n=56) werden mit dunkelgrauen Balken dargestellt, *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus (*N. lactamica* 5/5, n=64) mit hellgrauen Balken. Die insgesamt drei Stämme mit *penA* 0/5- bzw. 4/5-Allel wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.



**Abb. 12:** Boxplots der MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme mit 3/5-Polymorphismus (*N. lactamica* 3/5, n=56) und der *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus (*N. lactamica* 5/5, n=64).

Fasst man die Verteilung der verschiedenen *penA*-Polymorphismen bei *N. lactamica* zusammen, so lässt sich feststellen, dass die im sensiblen und niedrigen intermediär-resistenten Bereich (MIC-Bereich: 0,064 – 0,38 µg/ml) gelegenen *N. lactamica*-Stämme

Allele mit 3/5-Polymorphismus aufwiesen, während bei den resistenten (MIC-Bereich: 0,5 – 2,0 µg/ml) und im höheren intermediär-resistenten Bereich (MIC-Bereich: 0,125 – 0,38 µg/ml) gelegenen Isolaten Allele mit 5/5-Polymorphismus gefunden wurden.

Betrachtet man die in Kapitel 3.1.2 ermittelten MIC-Werte in den Erhebungsorten und vergleicht sie mit den Ergebnissen der genotypischen Analyse, so zeigt sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem Anteil von Stämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allel und den Medianen der MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme der betroffenen Städte (Pearson-Koeffizient: 0,90, Tabelle 6). Augsburg, das sich als einzige Stadt signifikant von anderen Städten unterschieden hat, hat den höchsten Anteil von Stämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allel (mit Ausnahme des aufgrund seiner geringen Fallzahl hier zu vernachlässigenden Sonthofens). Folgerichtig kann angenommen werden, dass die unterschiedliche Häufigkeit von 5/5- Polymorphismus-Allelen in den verschiedenen Städten eine Rolle für die Differenzen in den MIC-Werten zwischen den einzelnen Städten spielt und die in dieser Studie beobachteten signifikanten Unterschiede zwischen Augsburg und Griesbach bzw. Augsburg und Ansbach auf diesen Sachverhalt zurückzuführen sind.

**Tabelle 6:** MIC-Werte und Anteil von 5/5 Polymorphismus-Allelen in den verschiedenen Städten. Dargestellt sind der Median sowie der Interquartilsabstand der MIC-Werte in den jeweiligen Städten (in µg/ml).

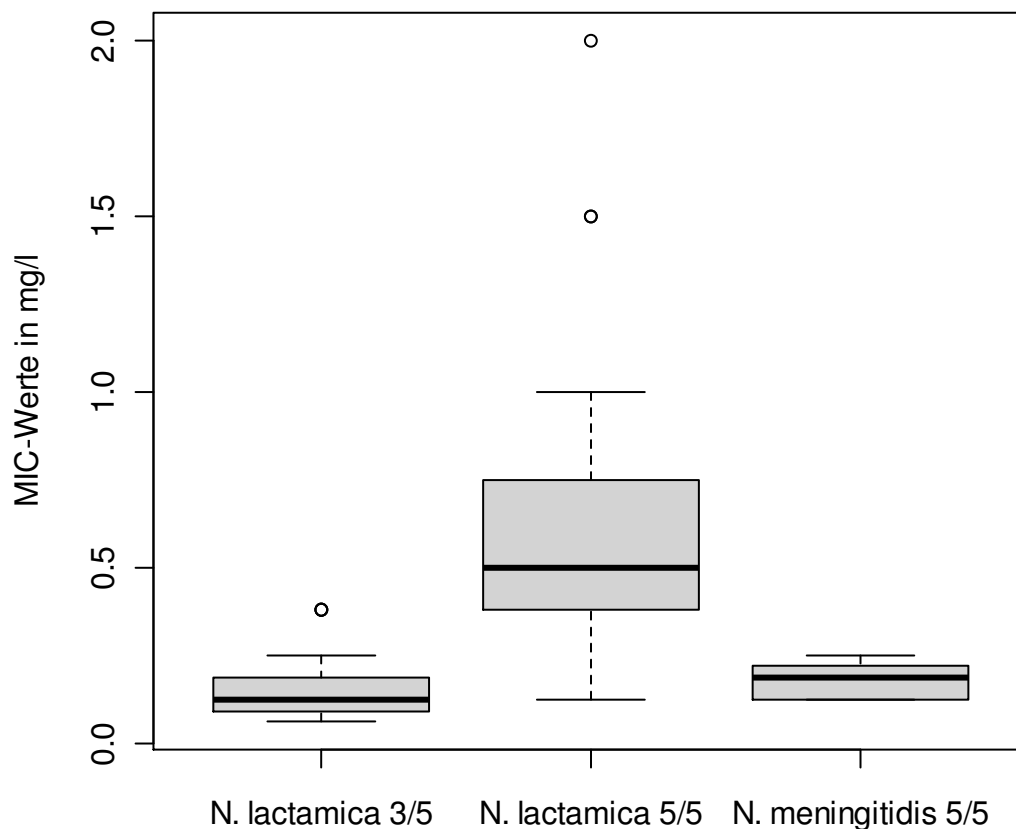
Stadt	n	Median	IQR (Inter-quartilsabstand) <sup>a</sup>	Anteil von 5/5 <i>penA</i> -Allelen (in Prozent)
<b>Augsburg</b>	22	0,625	0,38-0,75	81,2
<i>(Sonthofen)</i>	2	0,625	0,25-1,0	100,0
<b>Erlangen</b>	19	0,5	0,19-0,75	57,9
<b>Griesbach</b>	14	0,285	0,125-0,38	50,0
<b>München</b>	17	0,25	0,125-0,5	58,8
<b>Weiden</b>	7	0,25	0,19-0,38	28,6
<b>Ansbach</b>	16	0,19	0,125-0,44	37,5
<b>Ingolstadt</b>	15	0,19	0,125-0,44	26,7
<b>Pfarrkirchen</b>	11	0,19	0,101-0,44	36,4

<sup>a</sup>Dargestellt sind das erste und dritte Quartil (25% und 75% Perzintile).

### 3.2.4 Vergleich der genotypischen Analyse bei *N. lactamica* und *N. meningitidis*

Bei einem Vergleich der MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel mit den MIC-Werten der Meningokokkenstämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel konnte gezeigt werden, dass die *N. lactamica*-Stämme signifikant höhere MIC-Werte aufwiesen ( $p$ -Wert  $< 0,001$ , Abb. 13).

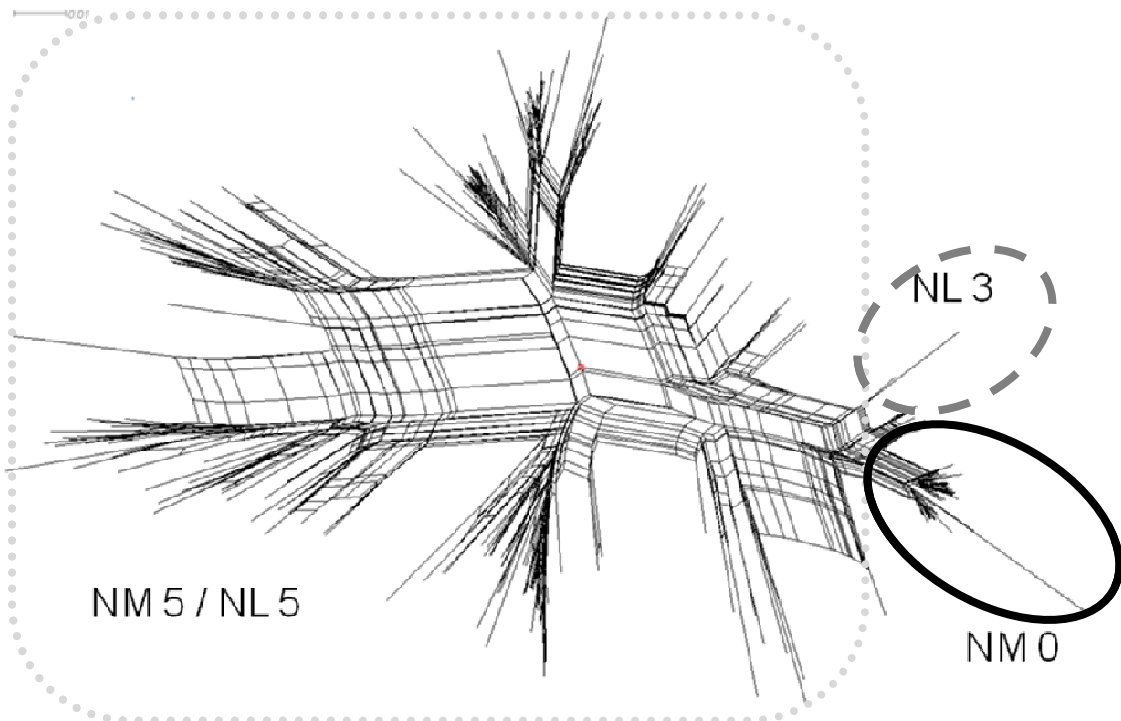
Die MIC-Werte der Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel sind also deutlich unterhalb der MIC-Werte der vergleichbaren *N. lactamica*-Stämme angesiedelt. Sie unterscheiden sich allerdings nicht signifikant von den MIC-Werten der *N. lactamica*-Stämme mit 3/5-Polymorphismus-Allel ( $p = 0.236$ , Abb. 13).



**Abb. 13:** : Boxplots der MIC-Werte der *N. lactamica*-Stämme mit 3/5-Polymorphismus-Allel (*N. lactamica* 3/5,  $n=56$ ), der *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel (*N. lactamica* 5/5,  $n=64$ ) und der *N. meningitidis*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel (*N. meningitidis* 5/5,  $n=7$ ).

### 3.3 Phylogenetische Analyse

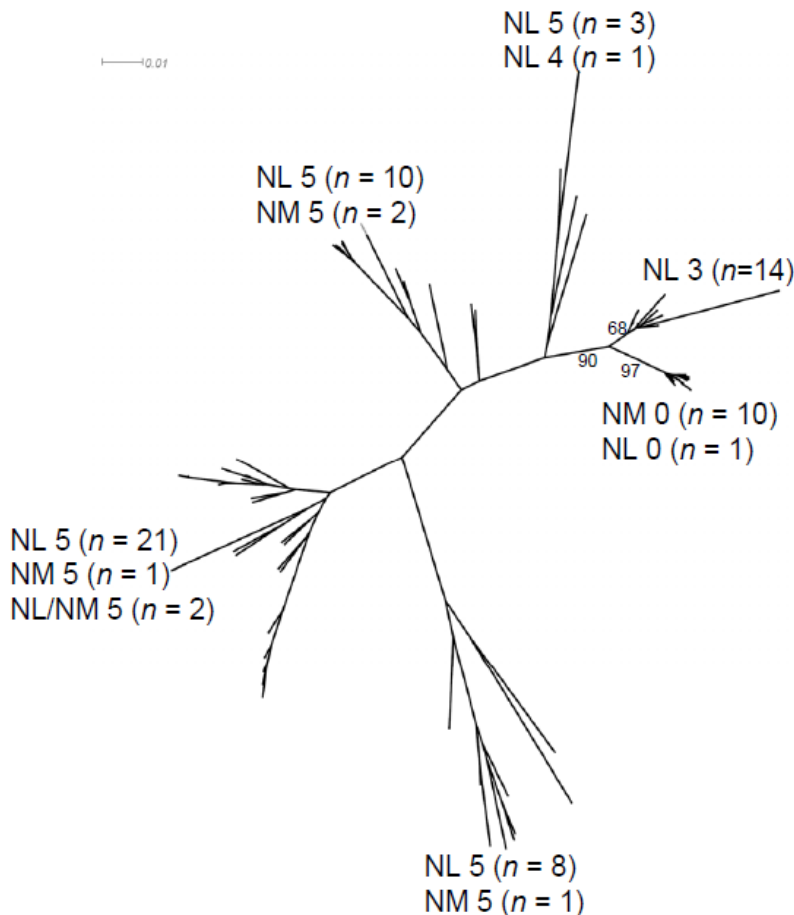
Um weitere Informationen über den untersuchten Abschnitt des *penA*-Gens zu gewinnen, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die in dieser Studie vorkommenden *penA*-Allele zusammen mit allen *penA*-Allelen der *penA*-Datenbank (Stand 08/2008) untersucht. Diese Analyse wurde mit dem Programm Jalview 2.0 durchgeführt. Der entstandene Baum basiert auf einer *split decomposition* (Abb. 14).



**Abb. 14:** *split decomposition*-Darstellung aller *penA*-Allele dieser Studie zusammen mit allen *penA*-Allelen der *penA*-Datenbank (Stand 08/2008). *N. lactamica*-Allele mit 3/5-Polymorphismus (NL 3) sind von einer grau gestrichelten Ellipse umgeben, *N. meningitidis*-Allele mit 0/5-Polymorphismus (NM 0) von einer schwarzen Ellipse. *N. lactamica*-Allele mit 5/5-Polymorphismus (NL 5) und *N. meningitidis*-Allele mit 5/5-Polymorphismus (NM 5) verteilen sich innerhalb des hellgrau gepunkteten Kastens. Die Analyse wurde mit Jalview 2.0 durchgeführt (Huson & Bryant, 2006).

Weitergehend wurden die bei den Stämmen dieser Studie vorkommenden *penA*-Allele gesondert mit dem Programm SplitsTree 4.10 analysiert (Abb. 15).

- Ergebnisse -



**Abb. 15:** Neighbour joining tree aller im Rahmen dieser Studie vorkommenden *penA*-Allele. *N. lactamica*-Allele mit 3/5-Polymorphismus (NL 3, n=14), *N. lactamica*-Allele mit 0/5-Polymorphismus (NL 0, n=1), *N. lactamica*-Allele mit 4/5-Polymorphismus (NL 4, n=1) und *N. meningitidis*-Allele mit 0/5-Polymorphismus (NM 0, n=10) sind separat dargestellt. *N. lactamica*-Allele mit 5/5-Polymorphismus (NL 5, n=45) und *N. meningitidis*-Allele mit 5/5-Polymorphismus (NM 5, n=6) überlappen sich in zwei Fällen, so dass diese zusammen dargestellt werden. Bootstrap values sind in dem Bereich verzeichnet, der NL 3, NM 0 und NL 0 von den Allelen mit 5/5-Polymorphismus abtrennt. Die Analyse wurde mit SplitsTree 4.10 durchgeführt (Huson, 1998).

Bei beiden Analysen ergab sich ein vergleichbares Bild. Die 3/5-Polymorphismus-Allele der *N. lactamica*-Stämme und die 0/5-Polymorphismus-Allele der *N. meningitidis*-Stämme bildeten jeweils eine eigene phylogenetische Gruppe, während die Allele mit fünf Mutationen beider Spezies phylogenetisch nicht abtrennbar waren. Zwei 5/5-Polymorphismus-Allele kamen sowohl bei *N. meningitidis* als auch bei *N. lactamica* vor. Bei Betrachtung der Bootstrap values bestätigte sich der optische Eindruck, dass die 3/5-Polymorphismus-Allele und die 0/5-Polymorphismus-Allele jeweils eine sehr homogene Gruppe bildeten, während die 5/5-Polymorphismus-Allele eine große Heterogenität aufwiesen. Auch waren die Abstände zwischen den 3/5-

Polymorphismus-Allelen und den 0/5-Polymorphismus-Allelen sehr gering, so dass man beide Gruppen deutlich von den 5/5-Allelen abgrenzen konnte.

Außerdem fiel auf, dass die Variabilität des *penA*-Gens bei den *N. lactamica*-Stämmen deutlich größer war als bei den *N. meningitidis*-Stämmen. Insgesamt konnten bei den 129 *N. meningitidis*-Stämmen nur 16 verschiedene *penA*-Allele nachgewiesen werden, während sich unter den 123 *N. lactamica*-Stämmen 60 unterschiedliche *penA*-Allele fanden. Dies passt zu der im Vergleich zu *N. meningitidis* generell höheren Diversität bei *N. lactamica* (Bennett et al., 2005).

### 3.4 Transformationsexperimente

Um den horizontalen Gentransfer zwischen *N. lactamica* und *N. meningitidis* adäquat darstellen zu können, wurden *in vitro*-Transformationsexperimente durchgeführt, die die tatsächliche *in vivo*-Situation im menschlichen Nasopharynx simulieren sollten.

Hierfür wurde ein sensibler Meningokokkenstamm mit einem *penA*-Allel mit 0/5-Polymorphismus (Stamm  $\alpha 14$ ) als Rezipient gewählt, der mit Mischungen chromosomaler DNA aus unterschiedlichen Gruppen transformiert wurde.

Um möglichst umfassende Erkenntnisse gewinnen zu können, wurden drei verschiedene Donor-Gruppen gebildet – eine aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel, eine aus *N. lactamica*-Stämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allel und eine aus *N. lactamica*-Stämmen mit 3/5-Polymorphismus-Allel (Tabelle 7). Jede Gruppe beinhaltete vier Stämme mit unterschiedlichen *penA*-Allelen, deren chromosomale DNA zu gleichen Mengen dem Empfängerstamm zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurde der Empfängerstamm  $\alpha 14$  mit seiner eigenen chromosomalen DNA transformiert. Alle Transformationsexperimente wurden zweimal unter gleichen Bedingungen vollständig wiederholt (n=3), so dass je 15 Transformanten untersucht werden konnten.

**Tabelle 7:** Phänotypische und genotypische Charakteristika des Rezipientenstammes  $\alpha$ 14 und der DNA-Donorstämme sowie ihre jeweilige Gruppenzugehörigkeit.

Stamm	MIC( $\mu$ g/ml)	<i>penA</i> -Allel	Positionen 504, 510, 515, 541 und 566 des PBP2 <sup>a</sup>	Gruppe
$\alpha$ 14	0,047	2	FAIHI	<i>N. meningitidis</i> 0/5
10490	0,094	146		
10514	0,125	7		
10549	0,125	52	LVVNV	<i>N. meningitidis</i> 5/5
10694	0,25	13		
$\beta$ 47	0,75	226		
$\beta$ 159	2	240		
$\beta$ 175	0,75	110	LVVNV	<i>N. lactamica</i> 5/5
$\beta$ 254	1,5	250		
$\beta$ 20	0,19	242		
$\beta$ 39	0,094	225		
$\beta$ 53	0,094	222	FAVNV	<i>N. lactamica</i> 3/5
$\beta$ 108	0,125	224		

<sup>a</sup> Beteiligte Aminosäuren (Einbuchstabencode): Phenylalanin (F), Alanin (A), Isoleucin (I), Histidin (H), Leucin (L), Valin (V), Asparagin (N)

### 3.4.1 Ergebnisse des Transformationsexperiments mit DNA aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel

Die Transformation des  $\alpha$ 14-Stammes mit DNA aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel diente unter Anderem dazu, festzustellen, ob unter den von uns gewählten Bedingungen überhaupt ein Transfer des *penA*-Allels möglich war.

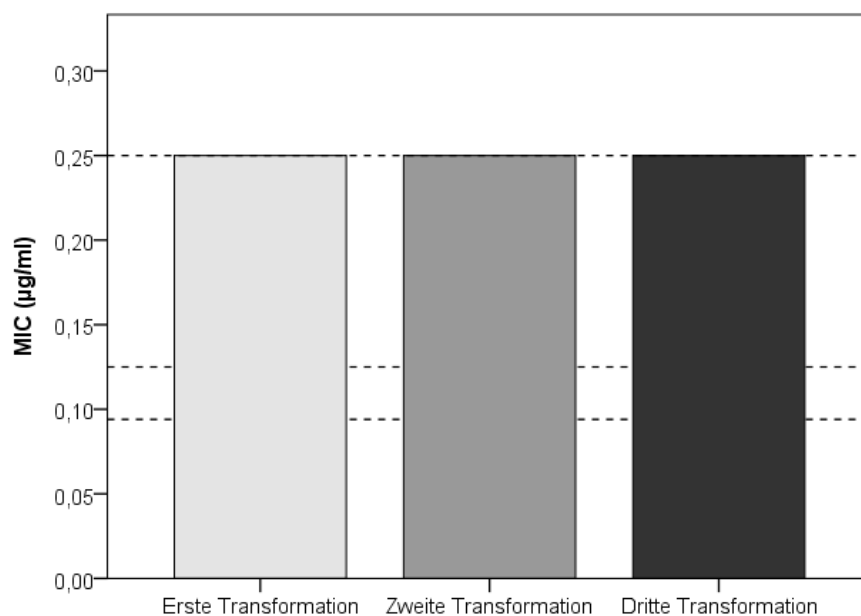
Bei der phänotypischen Analyse konnte gezeigt werden, dass schon nach der ersten Transformation ein Anstieg des MIC-Wertes von 0,047  $\mu$ g/ml bis auf 0,25  $\mu$ g/ml zu verzeichnen war. Durch die folgenden Transformationen fand keine weitere Veränderung des MIC-Wertes statt (Tabelle 8, Abb. 16). Damit erreichten die Transformanten bei diesem Transformationsexperiment MIC-Werte, die dem Niveau der Stämme entsprachen, aus welchen die zugesetzte chromosomale DNA stammte (Spannweite: 0,094 - 0,25  $\mu$ g/ml).

- Ergebnisse -

In der genotypischen Analyse konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Alle Transformanten wiesen dasselbe *penA*-Allel (Allel 13) auf, welches auch der Ausgangsstamm mit dem höchsten MIC-Wert trug (Tabelle 8). Somit hat hier der Empfängerstamm unter Selektionsdruck das *penA*-Allel aus der zugesetzten chromosomalen DNA übernommen, das den eigenen MIC-Wert am meisten steigern konnte.

**Tabelle 8:** Transformation von  $\alpha 14$  mit chromosomaler DNA aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel. Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analyse der Transformanten nach den drei durchgeführten Transformationen.

	1. Transformation (n=15)	2. Transformation (n=15)	3. Transformation (n=15)
<b>MIC (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
<i>Median</i>	0,25	0,25	0,25
<i>75%-Quantil</i>	0,315	0,25	0,38
<i>25%-Quantil</i>	0,25	0,25	0,25
<b><i>penA</i>-Allele</b>	13	13	13



**Abb. 16:** Phänotypische Ergebnisse der Transformation von  $\alpha 14$  mit chromosomaler DNA aus *N. meningitidis* mit 5/5-Polymorphismus-Allel. Die MIC-Werte der vier Donorstämme (0,094, 0,125, 0,125, 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) sind mit gestrichelten Linien dargestellt.



### 3.4.2 Ergebnisse des Transformationsexperiments mit DNA aus *N. lactamica* mit 5/5-Polymorphismus-Allel

Auch beim Transformationsexperiment mit einem DNA-Mix von *N. lactamica*-Stämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allel konnte der MIC-Wert des  $\alpha$ 14-Stammes bei der ersten Transformation deutlich erhöht werden. Es ergab sich hierbei ein Anstieg von 0,047  $\mu\text{g/ml}$  auf 0,19  $\mu\text{g/ml}$ . In der folgenden Transformation konnte der MIC-Wert nicht gesteigert werden, während in der dritten Transformationsrunde nochmals ein kleiner Anstieg auf 0,25  $\mu\text{g/ml}$  stattfand (Abb. 17). Die erreichten Werte lagen deutlich unter dem MIC-Niveau der Donorstämme (Spannweite: 0,5 - 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ).

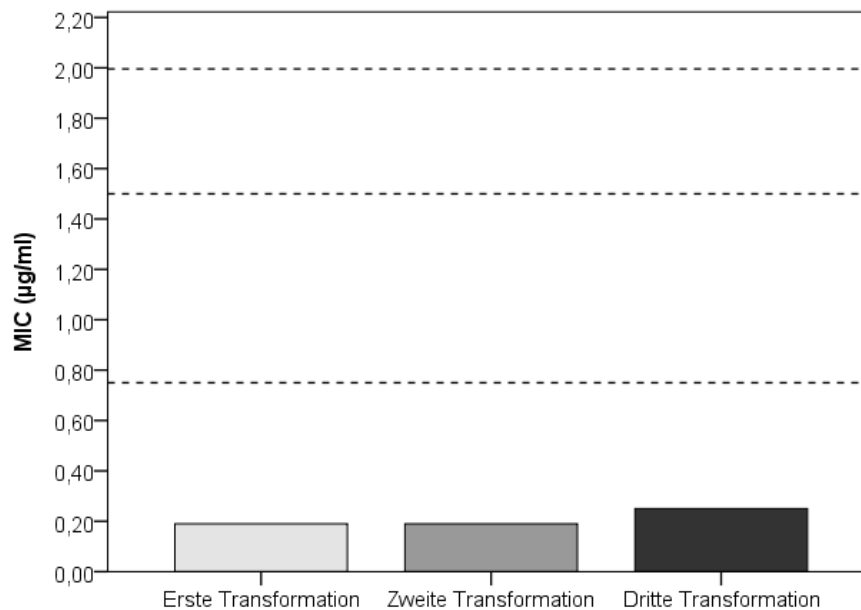
In der genotypischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass ein Transfer von *penA*-Allelen stattfand. Es fanden sich bei den Transformanten alle Allele der Donorstämme. Am häufigsten konnte das Allel des Stammes festgestellt werden, welcher den höchsten MIC-Wert aufwies (Allel 240). Ein Transformant trug ein Allel, welches nicht aus den Donorstämmen stammte (Tabelle 9). Es wies eine Punktmutation gegenüber dem Allel des Stammes mit dem höchsten MIC-Wert auf (Allel 240).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass auch in dieser Transformationsgruppe sowohl ein Anstieg des MIC-Wertes als auch ein Austausch des *penA*-Allels zu verzeichnen war. Es wurde allerdings nicht das MIC-Niveau der Ausgangsstämme erreicht, obwohl deren *penA*-Allele auf den Empfängerstamm übertragen wurden.

**Tabelle 9:** Transformation von  $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus *N. lactamica* mit 5/5-Polymorphismus-Allel. Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analyse der Transformanten nach den drei durchgeführten Transformationen.

	1. Transformation (n=15)	2. Transformation (n=15)	3. Transformation (n=15)
<b>MIC (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
<i>Median</i>	0,19	0,19	0,25
<i>75%-Quantil</i>	0,25	0,25	0,25
<i>25%-Quantil</i>	0,19	0,19	0,19
<b><i>penA</i>-Allele</b>	110, 226, 240, 250 <sup>a</sup>	110, 226, 240, 250 <sup>a</sup>	110, 226, 240, 250 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ein Transformant trug nach allen drei Transformationen ein Allel, welches sich in einer Base vom Allel 240 unterschied. Es wurde mit Allel 250 bezeichnet.



**Abb. 17:** Phänotypische Ergebnisse der Transformation von  $\alpha 14$  mit chromosomaler DNA aus *N. lactamica* mit 5/5-Polymorphismus-Allel. Die MIC-Werte der vier Donorstämme (0,75, 0,75, 1,5, 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ) sind mit gestrichelten Linien dargestellt.

### 3.4.3 Ergebnisse des Transformationsexperiment mit DNA aus *N. lactamica* mit 3/5-Polymorphismus-Allel

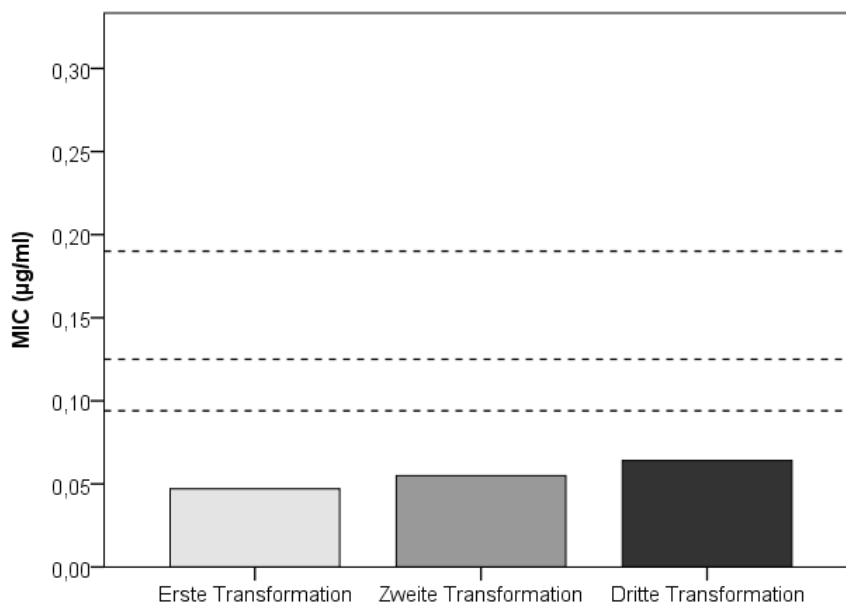
Mit Hilfe dieses Transformationsexperimentes sollte überprüft werden, ob auch Allele mit 3/5-Polymorphismus auf Meningokokken übertragen werden können und welchen Einfluss eine solche Transformation auf die MIC-Werte hat. Bei der ersten Transformation wurde keine Erhöhung des MIC-Wertes erreicht. Auch bei der zweiten und dritten Transformation war nur ein minimaler Anstieg des MIC-Wertes auf 0,064  $\mu\text{g/ml}$  zu verzeichnen (Tabelle 10, Abb. 18).

Genotypisch zeigten alle Transformanten das *penA*-Allel, das auch vom Rezipientenstamm  $\alpha 14$  getragen wird (Allel 2). Es tauchte kein Allel aus der zugesetzten chromosomalen DNA auf.

Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass es hier zu keiner Transformation des *penA*-Allels gekommen ist. Die Ursache für die leichte Erhöhung des MIC-Wertes kann in der Transformation eines anderen Faktors liegen. Sie könnte aber auch durch eine Spontanmutation unter Selektionsdruck verursacht worden sein oder durch eine Messabweichung der Etest-Methode erklärt werden.

**Tabelle 10:** Transformation von  $\alpha 14$  mit chromosomaler DNA aus *N. lactamica* mit 3/5-Polymorphismus-Allel. Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analyse der Transformanten nach den drei durchgeführten Transformationen.

	1. Transformation (n=15)	2. Transformation (n=15)	3. Transformation (n=15)
<b>MIC (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
<i>Median</i>	0,047	0,056	0,064
75%-Quantil	0,047	0,064	0,064
25%-Quantil	0,032	0,047	0,064
<b><i>penA</i>-Allele</b>	2	2	2



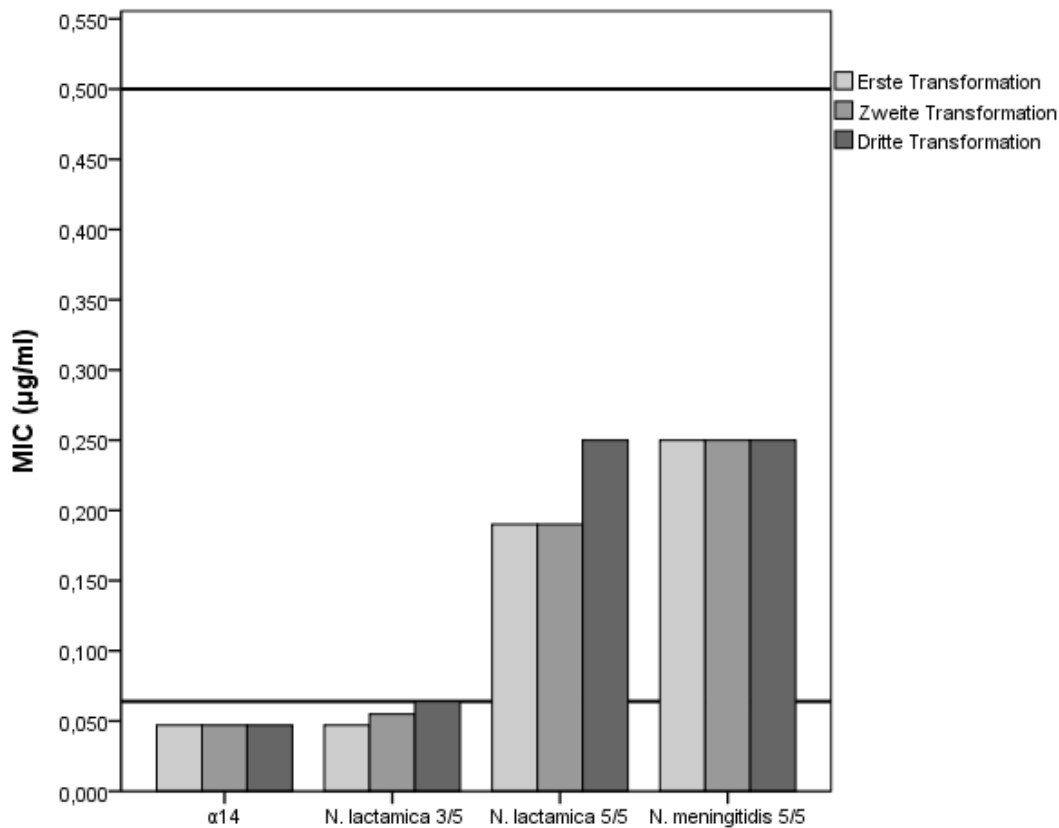
**Abb. 18:** Phänotypische Ergebnisse der Transformation von  $\alpha 14$  mit chromosomaler DNA aus *N. lactamica* mit 3/5-Polymorphismus-Allel. Die MIC-Werte der vier Donorstämme (0,094, 0,094, 0,125, 0,19  $\mu\text{g/ml}$ ) sind mit gestrichelten Linien dargestellt.

### 3.4.4 Vergleich und Zusammenfassung der Transformationsergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse der einzelnen Transformationsexperimente, so zeigt sich, dass unabhängig von der Donorspezies die Transformation von *penA*-Allelen mit 5/5-Polymorphismus möglich und unter Selektionsdruck mit Penicillin sogar sehr wahrscheinlich ist.

Die Transformation eines solchen Allels war in den Experimenten dieser Studie ein single-step-Ereignis (Abb. 19). Nach einmaliger Übertragung war keine weitere

signifikante Erhöhung des MIC-Wertes mehr möglich. Auch kam es nach der ersten Transformation zu keiner Veränderung der *penA*-Allele mehr. 3/5-Polymorphismus-Allele konnten nicht übertragen werden. Durch Transformation der 5/5-Polymorphismus-Allele von *N. lactamica* konnte ein Anstieg des MIC-Wertes des Rezipientenstammes erreicht werden. Die beobachteten MIC-Werte entsprachen denen, die auch durch Transformation der 5/5-Polymorphismus-Allele von *N. meningitidis* erreicht werden konnten. MIC-Werte, wie sie bei den *N. lactamica*-Donorstämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allelen beobachtet wurden (Spannweite: 0,5 - 2,0 µg/ml), konnten nicht erreicht werden.



**Abb. 19:** Phänotypische Analyse der Transformationsexperimente. Die Säulen repräsentieren die Mediane der ermittelten MIC-Werte der untersuchten Transformanten nach dem jeweiligen Transformationsschritt (hellgrau nach der ersten Transformation, mittelgrau nach der zweiten Transformation, dunkelgrau nach der dritten Transformation). Auf der x-Achse sind nebeneinander die Gruppen aufgetragen, mit deren DNA der Rezipientenstamm α14 transformiert wurde. Die untere horizontale Linie stellt den Umschlagspunkt von sensibel zu intermediär resistent dar (0,064 µg/ml), die obere den Umschlagspunkt von intermediär resistent zu resistent (0,5 µg/ml).

#### 4. Diskussion

Meningokokken zeigen zunehmend eine herabgesetzte Sensibilität gegenüber Penicillin G (Richter *et al.*, 2001; Taha *et al.*, 2007; Tapsall *et al.*, 2001; Vazquez, 2001). Eine ähnliche Entwicklung wird seit den achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts bei Pneumokokken beobachtet und führte zum gehäuften Auftreten hochgradig resistenter Pneumokokkenisolate (Appelbaum, 1987). Genau wie Meningokokken waren auch Pneumokokken lange Zeit sensibel gegenüber Penicillin, ehe sie durch horizontalen Gentransfer von sogenannten low-affinity PBPs (Penicillinbindungsproteine, die eine geringe Bindungsaffinität gegenüber Penicillin aufweisen) eine zuvor bei Pneumokokken nicht vorkommende Form von Penicillinresistenz erworben haben (Hauser *et al.*, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese low-affinity PBPs ursprünglich in Oralstreptokokken entstanden sind und von diesen auf Pneumokokken übertragen wurden (Sibold *et al.*, 1994). Um herauszufinden, ob auch bei Neisserien ein horizontaler Gentransfer von low-affinity PBPs aus kommensalen *Neisseria spp.* eine Rolle bei der Entwicklung des Resistenzverhaltens von *N. meningitidis* spielt, wurde in der vorliegenden Studie beispielhaft *N. lactamica* untersucht, da diese Spezies mit *N. meningitidis* genetisch eng verwandt ist.

Die Ergebnisse einer spanischen Studie, welche für *N. lactamica* ein deutlich höheres Resistenzniveau gegenüber Penicillin G als für *N. meningitidis* nachweisen konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit für eine deutsche *N. lactamica*-Population bestätigt (Arreaza *et al.*, 2002). Es zeigte sich, dass nicht nur die durchschnittlichen MIC-Werte von *N. lactamica* signifikant höher waren als die von *N. meningitidis*, sondern auch höhere Maximalwerte erreicht wurden. Die untersuchten *N. meningitidis*-Stämme der vorliegenden Studie wiesen ähnliche MIC-Werte auf wie sie auch zuvor in vergleichbaren Untersuchungen dokumentiert werden konnten (Taha *et al.*, 2007; Vazquez, 2001; Vogel *et al.*, 2008). Es ist also davon auszugehen, dass zumindest in Europa *N. lactamica* mit deutlich höheren MIC-Werten gegenüber Penicillin G verbunden ist als *N. meningitidis*.

Betrachtet man die phänotypische Analyse innerhalb der *N. lactamica*-Stämme, so konnte einzig der Ort der Stammisolation als Einflussfaktor für die innerhalb der

Spezies differierenden MIC-Werte identifiziert werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die MIC-Werte in den jeweiligen Städten und die relativen Häufigkeiten von 5/5-Polymorphismus-Allelen stark miteinander korrelieren und die beobachteten Differenzen zwischen einigen Städten auf das gehäufte Auftreten von 5/5-Polymorphismus-Allelen an bestimmten Erhebungsorten zurückzuführen sind. Insbesondere die hohen MIC-Werte in Augsburg könnten mit der Expansion eines klonalen Komplexes mit 5/5-Polymorphismus-Allel zusammenhängen, dessen Verbreitung durch den Selektionsvorteil einer hohen Penicillinresistenz begünstigt worden sein könnte. Um genauere Aussagen hierzu treffen zu können, ist eine Sequenztypisierung der betroffenen *N. lactamica*-Stämme aus Augsburg notwendig, welche bislang nicht durchgeführt worden ist.

Untersucht man den für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierenden Abschnitt des *penA*-Gens bei *N. meningitidis* und *N. lactamica*, so liegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Spezies vor. 5/5-Polymorphismus-Allele konnten bei beiden Spezies gefunden werden. Sie waren im Vergleich zur Gesamtpopulation der jeweiligen Spezies mit dem Auftreten signifikant erhöhter MIC-Werte verbunden. In der phylogenetischen Analyse bildeten die 5/5-Polymorphismus-Allele unabhängig von der zugehörigen Spezies zusammen einen Clade. Dieser gemeinsame Genpool deutet auf einen bestehenden horizontalen Gentransfer von 5/5-Polymorphismus-Allelen zwischen den verschiedenen *Neisseria spp.* hin. Vergleicht man die Prävalenz von 5/5-Polymorphismus-Allelen bei *N. lactamica* (64 von 123) und *N. meningitidis* (7 von 129), so kann angenommen werden, dass der horizontale Gentransfer von *N. lactamica* auf *N. meningitidis* gerichtet ist. Diese These wird auch durch die höhere genetische Diversität der *penA*-Allele bei *N. lactamica* unterstützt, wobei berücksichtigt werden muss, dass die genetische Diversität bei *N. lactamica* auch insgesamt größer ist als bei *N. meningitidis* (Bennett *et al.*, 2005). Gegen einen regen horizontalen Gentransfer innerhalb des Genus der Neisserien (und damit einen gemeinsamen Genpool) spricht allerdings, dass in dieser Studie nur zwei *penA*-Allele bei beiden Spezies vorkamen (Lujan *et al.*, 1991; Saez-Nieto *et al.*, 1990; Spratt *et al.*, 1989; Spratt *et al.*, 1992). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei Transformationen Mosaikgene entstehen, welche für die hohe Diversität und die beobachteten Allelunterschiede verantwortlich sein könnten (Saez-Nieto *et al.*, 1990).

*PenA*-Allele, die statt den bekannten fünf Punktmutationen in dem für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierenden Abschnitts nur deren drei trugen, kamen ausschließlich bei *N. lactamica* vor und konnten in den Transformationsexperimenten dieser Studie nicht auf Meningokokken übertragen werden. Zumindest bei *N. lactamica* sind diese 3/5-Polymorphismus-Allele mit signifikant niedrigeren MIC-Werten verbunden als 5/5-Polymorphismus-Allele. Da die MIC-Werte bei *N. meningitidis* insgesamt deutlich niedriger sind als bei *N. lactamica*, kann davon ausgegangen werden, dass die Übertragung von 3/5-Polymorphismus-Allelen auf Meningokokkenstämme mit 0/5-Polymorphismus-Allel keine bedeutsame Erhöhung der MIC-Werte zur Folge haben würde und sich somit auch kein Selektionsvorteil ergeben würde. Dementsprechend wurden sie weder im Rahmen der Transformationsexperimente dieser Studie noch *in vivo* unter Selektionsdruck durch Penicillin auf Meningokokken übertragen. Weitergehende Untersuchungen im Sinne einer Klonierung eines 3/5-Polymorphismus-Allels in einen *N. meningitidis*-Stamm sind notwendig, um diese Hypothese entscheidend bekräftigen zu können und auszuschließen, dass es andere Ursachen für das völlige Fehlen von 3/5-Polymorphismus-Allelen bei *N. meningitidis* gibt. Die bei Meningokokken sehr häufig vorkommenden 0/5-Polymorphismus-Allele (122 von 129 Stämmen) traten bei *N. lactamica* nur sehr selten auf (2 von 123 Stämmen) und scheinen keinen Selektionsvorteil für *N. lactamica* darzustellen.

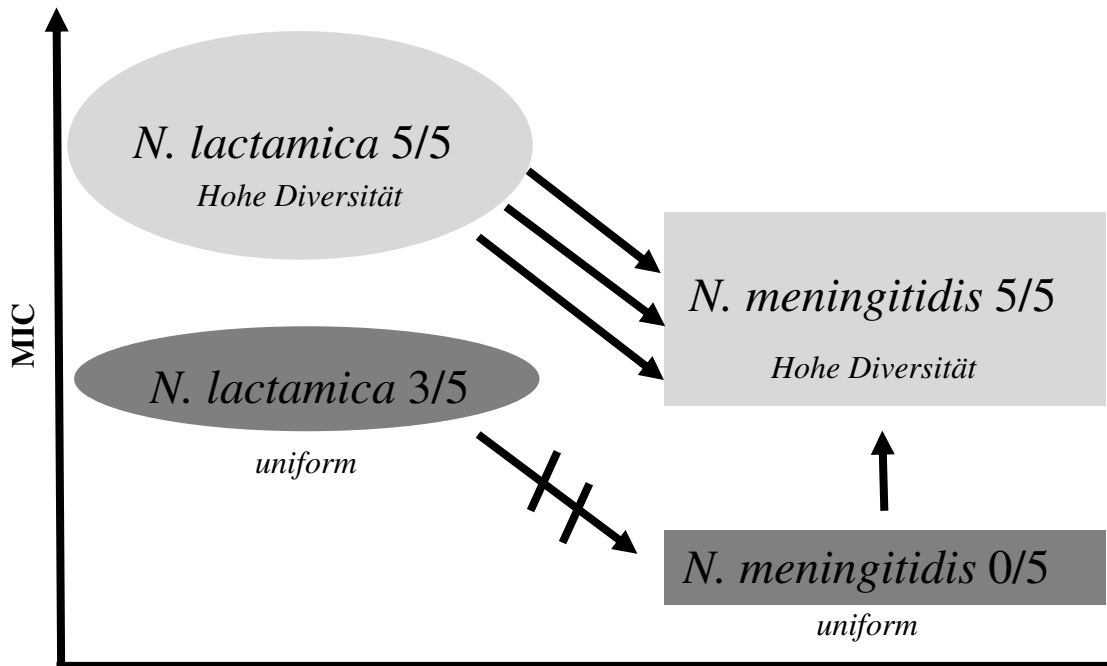
Insgesamt decken sich die beobachteten Ergebnisse der genotypischen Analyse für *N. meningitidis* mit früheren Studien, die im Rahmen der Erfassung von *penA*-Allelen in der *penA*-Datenbank und der Arbeit der nationalen Meningokokkenreferenzzentren durchgeführt wurden (Taha *et al.*, 2007; Thulin *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2008). Für *N. lactamica* lagen bisher keine anderen Untersuchungen vor.

Fasst man die Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analyse zusammen, so kann man bei Meningokokken eine große, sehr homogene Gruppe mit 0/5-Polymorphismus-Allel und niedrigen MIC-Werten sowie eine kleine, heterogene Gruppe mit 5/5-Polymorphismus-Allel und deutlich höheren MIC-Werten identifizieren. Eine solche heterogene Gruppe mit 5/5-Polymorphismus-Allel gibt es auch bei *N. lactamica*, allerdings umfasst sie ungefähr die Hälfte aller Stämme und weist signifikant höhere MIC-Werte auf als die 5/5-Polymorphismus-Allel-Gruppe bei

*N. meningitidis*. Parallel zur 0/5-Polymorphismus-Allel-Gruppe bei Meningokokken existiert bei *N. lactamica* eine homogene Gruppe mit 3/5-Polymorphismus-Allel, die ebenfalls knapp die Hälfte der *N. lactamica*-Stämme beinhaltet und signifikant niedrigere MIC-Werte aufweist als die *N. lactamica* 5/5-Polymorphismus-Allel-Gruppe (Abb. 20). Es scheint also neben einem gemeinsamen Genpool für die 5/5-Polymorphismus-Allele zwei unabhängige Allelfamilien innerhalb der beiden Spezies zu geben. Dabei zirkulieren die 3/5-Polymorphismus-Allele innerhalb der *N. lactamica*-Stämme, welche hauptsächlich Kleinkinder kolonisieren. Die 0/5 Allele werden hingegen zwischen Meningokokken ausgetauscht, welche hauptsächlich bei Jugendlichen vorkommen.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimente konnte gezeigt werden, dass es unter Selektionsdruck durch Antibiotikagabe zu einem horizontalen Gentransfer von 5/5-Polymorphismus-Allelen von *N. lactamica* auf Meningokokken mit 0/5-Polymorphismus-Allel kommt, die dadurch ihre MIC-Werte in den intermediär-resistenten Bereich steigern können. Die hierbei erreichten MIC-Werte entsprechen denen von Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel, liegen aber deutlich unter den MIC-Werten der *N. lactamica*-Stämme mit 5/5-Polymorphismus-Allel. 3/5-Polymorphismus-Allele wurden auch unter Selektionsdruck nicht auf Meningokokken übertragen (Abb. 20). Sie sind also für sich betrachtet wohl mit keinem Selektionsvorteil verbunden und folgerichtig für keine höheren MIC-Werte verantwortlich als 0/5-Polymorphismus-Allele.





**Abb. 20:** Darstellung des möglichen horizontalen Gentransfers von 5/5 *penA*-Allelen von *N. lactamica* 5/5 (*N. lactamica*-Stämmen mit 5/5-Polymorphismus-Allel) auf *N. meningitidis* 0/5 (*N. meningitidis*-Stämmen mit 0/5-Polymorphismus-Allel) unter Selektionsdruck in Form von Antibiotika. Ein Transfer von 3/5 *penA*-Allelen war auch unter Selektionsdruck nicht möglich.

Um die Ursachen der generell höheren MIC-Werte bei *N. lactamica* näher beleuchten zu können, mussten zunächst die 5/5-Polymorphismus-Allele beider Spezies genau untersucht werden, um auszuschließen, dass relevante Unterschiede in diesen Allelen für die unterschiedlichen Resistenzniveaus verantwortlich sind.

Einige 5/5-Polymorphismus-Allele konnten in Isolaten beider Spezies gefunden werden (z.B. Allel 110). Die Unterschiede zwischen den MIC-Werten der entsprechenden Isolate waren vergleichbar mit den Unterschieden, die auch die Spezies insgesamt aufwiesen (z.B. Allel 110: 0,75 µg/ml in *N. lactamica*, 0,19 µg/ml in *N. meningitidis*). Im Rahmen der zuvor beschriebenen Transformationsexperimente konnte gezeigt werden, dass dasselbe *penA*-Allel bei einer Transformation von *N. lactamica* auf einen Meningokokkenstamm mit höchst unterschiedlichen MIC-Werten verknüpft war (z.B. Allel 240: 2,0 µg/ml in *N. lactamica*, 0,25 µg/ml in *N. meningitidis*). Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse konnten keine relevanten genetischen Unterschiede in dem für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierenden Abschnitts des *penA*-Gens beider Spezies finden. Somit scheiden Abweichungen in den 5/5-Polymorphismus-Allelen als Ursache der generell höheren MIC-Werte bei *N. lactamica* aus. Es müssen vielmehr

andere Faktoren hierfür verantwortlich sein, die die Spezies als Ganzes betreffen. In Frage kämen beispielsweise Zellwandbestandteile, die Dicke der Zellwand oder auch die Generationsdauer. Eine mögliche  $\beta$ -Lactamase-Produktion wurde für die Stämme dieser Studie ausgeschlossen.

Die Faktoren, die für die hohen MIC-Werte bei *N. lactamica* verantwortlich sind, konnten in unseren Experimenten nicht übertragen werden. Es hätten sonst deutlich höhere MIC-Werte bei den Transformanten der 5/5 *N. lactamica*-Gruppe auftreten müssen. Die *in vitro*-Experimente dieser Studie waren so aufgebaut, dass sie die *in vivo*-Situation möglichst gut simulieren sollten. Betrachtet man die daraus abgeleiteten Ergebnisse, so ist es als äußerst unwahrscheinlich zu erachten, dass die Co-Kolonisierung mit *N. lactamica* die MIC-Werte von *N. meningitidis* auf ähnliche Werte erhöhen kann, wie sie in dieser Studie bei *N. lactamica* beobachtet werden konnten. Dennoch ist es denkbar, dass aufgrund von horizontalem Gentransfer in Zukunft weitaus mehr Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allelen und damit auch mit intermediärer Penicillinresistenz auftreten werden. Der Selektionsdruck durch die immer häufiger in der ambulanten Krankenversorgung eingesetzten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika könnte eine entscheidende Rolle bei diesem Transfer von 5/5-Polymorphismus-Allelen von *N. lactamica* auf *N. meningitidis* spielen.

Die Ergebnisse und Aussagen dieser Arbeit weisen allerdings aus verschiedenen Gründen Limitationen auf. So wurde in allen genetischen Untersuchungen nie das ganze *penA*-Gen, sondern nur der für die Transpeptidaseregion des PBP2 kodierende Abschnitt analysiert. Zwar konnte für Meningokokken gezeigt werden, dass sich alle relevanten Veränderungen in diesem Abschnitt befinden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass im nicht untersuchten Abschnitt des Gens Mutationen vorliegen, die Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie haben könnten. Weiterhin konzentrierten sich alle Untersuchungen dieser Arbeit nur auf das *penA*-Gen, da es bei *N. meningitidis* die entscheidende Rolle für die Resistenzentstehung gegen Penicillin G spielt. Andere Kandidatengene wurden nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Unterschiede in diesen Genen könnten für die generell höheren MIC-Werte bei *N. lactamica* verantwortlich sein, so dass weitere Untersuchungen in diesem Bereich für ein tiefergehendes Verständnis notwendig sind. Betrachtet man die Auswahl der

untersuchten *N. lactamica*-Stämme, so muss festgestellt werden, dass sie nur in Bayern und nur in einem engen Zeitraum gesammelt wurden. Mögliche räumliche und zeitliche Einflussfaktoren konnten demnach nicht untersucht werden. Zudem wurden im Rahmen der Transformationsexperimente ausschließlich *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Diese sollten zwar eine bestmögliche Simulation der *in vivo*-Situation darstellen, sind aber natürlicherweise mit Limitationen behaftet (z.B. Nichtberücksichtigung von Wirtsfaktoren), welche die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse einschränken.

Eng mit der Fragestellung dieser Arbeit verbunden ist der Zusammenhang zwischen übermäßigem Antibiotikaeinsatz und bakterieller Resistenzentwicklung. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der Antibiotikaverbrauch bei Kleinkindern höher ist als in allen anderen Altersstufen (Sabuncu *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2005). So wurden beispielsweise in Deutschland bei Kindern unter vier Jahren acht DDD (*defined daily doses*) pro 1000 Einwohner verschrieben, während es in allen anderen Altersgruppen nicht mehr als fünf DDD waren (Schröder *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2005). Der Antibiotikaverbrauch ist in den ersten Jahren des Lebens, in denen die Trägerraten für *N. lactamica* am höchsten sind, also deutlich größer als bei Jugendlichen, bei denen die höchsten Trägerraten für Meningokokken vorliegen (Claus *et al.*, 2005; Gold *et al.*, 1978). Hinzu kommt, dass es sich bei den eingesetzten Antibiotika hauptsächlich um Penicillin- und  $\beta$ -Laktam-Antibiotika handelt (Goossens *et al.*, 2005). Die erhöhten MIC-Werte bei *N. lactamica* könnten demzufolge durch den regelmäßigen Kontakt mit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in den ersten Lebensjahren verursacht worden sein. Der fehlende Einfluss des Alters der Träger auf die MIC-Werte in der hier vorliegenden Studie wirkt dabei nicht entkräftigend, da keine Informationen darüber vorliegen, in welchem Alter die untersuchten *N. lactamica*-Stämme von den Trägern erworben worden sind und ältere Kinder bereits mit *N. lactamica*-Stämmen mit erhöhten MIC-Werten kolonisiert worden sein könnten.

Hieraus abgeleitet kann zudem die Frage aufgeworfen werden, ob die Versorgung mit Antibiotika Einfluss auf die Altersverteilung der *N. lactamica*-Träger hat. Bisher wurde die Tatsache, dass *N. lactamica* üblicherweise jüngere Kinder kolonisiert als *N. meningitidis*, darauf zurückgeführt, dass die Versorgung mit Laktose in den ersten Lebensjahren am höchsten ist. Es ist aber auch die Versorgung mit  $\beta$ -Laktam-

Antibiotika zu berücksichtigen, die *N. lactamica* einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Spezies in dieser ökologischen Nische verschafft haben könnte. Historische Trägerstudien aus der Zeit vor Einführung der Antibiotikatherapie könnten in diesem Zusammenhang eine aufklärende Wirkung haben. Sie fehlen allerdings völlig.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit muss auch auf die Problematik eines vernunftorientierten und sparsamen Antibiotikaeinsatzes eingegangen werden, welcher gerade im Kleinkindesalter sehr schwierig ist, da oft adäquate Studienergebnisse für die typischen Erkrankungen in dieser Altersgruppe fehlen und Antibiotika im Sinne einer besten individuellen Therapie dennoch eingesetzt werden. Für einen umstrittenen Anwendungsbereich von Antibiotika, die kindliche Otitis media, konnten zwei aktuelle randomisierte klinische Studien zeigen, dass eine primär antibiotische Therapie der Otitis media der oftmals angewandten Beobachtungsstrategie mit fakultativer Antibiotikagabe bei Verschlechterung überlegen ist (Hoberman *et al.*, 2011; Klein, 2011; Tahtinen *et al.*, 2011). Der beobachtete Effekt ist zweifelsohne groß genug, um eine routinemäßige Antibiotikatherapie der Otitis media zu rechtfertigen. Die Autoren beider Studien werfen allerdings die berechtigte Frage auf, welchen Einfluss der zu erwartende steigende Antibiotikaeinsatz zur Behandlung dieser häufigen bakteriellen Infektion im Kindesalter auf die Resistenzentwicklung gegenüber den verwendeten Antibiotika hat. Betroffen sind hierbei neben den eigentlichen Krankheitserregern auch kommensale Bakterienspezies wie *N. lactamica*. Deshalb werden weitere klinische Studien empfohlen, um eine optimale und individuelle Therapieentscheidung aufgrund des vorliegenden Schweregrades der Erkrankung treffen zu können. Dies ist zwingend notwendig, um eine adäquate Abwägung zwischen dem individuellen Nutzen für den behandelten Patienten und dem kollektiven Schaden für die Gesamtbevölkerung durch Resistenzentwicklungen treffen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Wie das pathogene Bakterium *Neisseria meningitidis* kolonisiert auch *Neisseria lactamica* als Kommensale den oberen Nasopharynx des Menschen. Penicillin G ist ein first-line-Therapeutikum gegen Meningokokkeninfektionen. Reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Penicillin wird bei Meningokokken durch Mutationen im *penA*-Gen verursacht. Horizontaler Gentransfer zwischen den verschiedenen *Neisseria spp.* wurde auch für das *penA*-Gen beschrieben. Ziel dieser Arbeit war daher eine phänotypische und genotypische Analyse der Penicillinresistenz von *N. lactamica*. Aus den Versuchen sollten Prognosen über die zukünftige Resistenzentwicklung von Meningokokken abgeleitet werden.

Die phänotypische Analyse von 123 *N. lactamica*-Stämmen (MIC [*Minimum inhibitory concentration*]-Bereich: 0,064 – 2,0 µg/ml, Median: 0,38 µg/ml) und 129 *N. meningitidis*-Stämmen (MIC-Bereich: 0,016 – 0,25 µg/ml, Median: 0,064 µg/ml) zeigte signifikant höhere MIC-Werte gegenüber Penicillin G bei den *N. lactamica*-Stämmen als bei den untersuchten Meningokokken.

Bei Meningokokken sind Polymorphismen (fünf spezifische Mutationen betreffend) im *penA*-Gen (kodiert für das PBP2 (penicillin binding protein 2)) für verminderte Penicillinsensibilität verantwortlich, weshalb der betroffene Abschnitt des *penA*-Gens in allen *N. lactamica*-Stämmen und *N. meningitidis*-Stämmen untersucht und mit den bekannten Allelen der *penA*-Datenbank verglichen wurde. Bei den 123 *N. lactamica*-Stämmen konnten 60 verschiedene *penA*-Allele nachgewiesen werden, wovon 51 neu in die internationale *penA*-Datenbank eingefügt werden konnten. Im Gegensatz zu Meningokokken trugen die *N. lactamica*-Stämme entweder drei oder fünf der für intermediär resistente Meningokokken charakteristischen Mutationen im *penA*-Gen. *N. lactamica*-Stämme mit fünf Mutationen (MIC-Bereich: 0,25 – 2,0 µg/ml, Median: 0,5 µg/ml) zeigten signifikant höhere MIC-Werte als Stämme mit drei Mutationen (MIC-Bereich: 0,064 – 0,38 µg/ml, Median: 0,125 µg/ml), aber auch als Meningokokken mit fünf Mutationen (MIC-Bereich: 0,064 – 0,25 µg/ml, Median: 0,125 µg/ml).

Eine phylogenetische Analyse aller in der *penA*-Datenbank hinterlegten Allele zusammen mit den 51 neuen dieser Studie ergab, dass die Allele mit fünf Mutationen unabhängig von der Spezies eine gemeinsame phylogenetische Linie bildeten, während

sowohl die Allele mit drei Mutationen (*N. lactamica*) als auch die ohne Mutationen (*N. meningitidis*) jeweils eine separate phylogenetische Gruppe formten.

Im Rahmen von *in vitro*-Transformationen mit chromosomaler DNA von *N. lactamica* konnte der MIC-Wert des Penicillin-sensiblen Meningokokkenstamms  $\alpha$ 14 in einem single-step-Ereignis durch Übernahme des betreffenden *penA*-Gens von *N. lactamica* erhöht werden. Allerdings konnten nur MIC-Werte erreicht werden, die mit intermediär-sensiblen Meningokokken vergleichbar waren und somit weit unter den MIC-Werten der benutzten *N. lactamica*-Stämme lagen.

Dieser Befund legt nahe, dass erhöhte MIC-Werte bei *N. lactamica* wie auch bei Meningokokken mit Mutationen in der Transpeptidaseregion des PBP2 assoziiert sind. Jedoch sind die im Vergleich zu Meningokokken generell höheren MIC-Werte bei *N. lactamica* auf andere Faktoren zurückzuführen, die bei *N. lactamica* eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Penicillin bedingen. In den *in vitro*-Experimenten der vorliegenden Studie konnten diese Faktoren nicht auf Meningokokken übertragen werden. Demnach kann eine Co-Kolonisation mit *N. lactamica* zwar die MIC-Werte von Meningokokken erhöhen, das Erreichen von bei *N. lactamica* beobachteten Resistenzniveaus ist allerdings auf diesem Wege nicht möglich. Es ist somit nicht zu befürchten, dass Meningokokken – wie bei Pneumokokken beobachtet – über kommensale Spezies der gleichen Gattung eine massive Reduktion der Empfindlichkeit gegenüber Penicillin entwickeln werden.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

**Alber, D., Oberkotter, M., Suerbaum, S., Claus, H., Frosch, M. & Vogel, U. (2001).** Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. *J Clin Microbiol* **39**, 1710-1715.

**Alcala, B., Salcedo, C., de la Fuente, L. & other authors (2004).** *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to ciprofloxacin: first report in Spain. *J Antimicrob Chemother* **53**, 409.

**Antignac, A., Ducos-Galand, M., Guiyoule, A., Pires, R., Alonso, J. M. & Taha, M. K. (2003).** *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive infections in France (1999-2002): phenotypes and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* **37**, 912-920.

**Appelbaum, P. C. & Lawrence, R. B. (1979).** Comparison of three methods for identification of pathogenic *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* **9**, 598-600.

**Appelbaum, P. C. (1987).** World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol* **6**, 367-377.

**Arreaza, L., de La Fuente, L. & Vazquez, J. A. (2000).** Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1705-1707.

**Arreaza, L., Salcedo, C., Alcala, B. & Vazquez, J. A. (2002).** What about antibiotic resistance in *Neisseria lactamica*? *J Antimicrob Chemother* **49**, 545-547.

**Bennett, J. S., Griffiths, D. T., McCarthy, N. D., Sleeman, K. L., Jolley, K. A., Crook, D. W. & Maiden, M. C. (2005).** Genetic diversity and carriage dynamics of *Neisseria lactamica* in infants. *Infect Immun* **73**, 2424-2432.

**Bennett, J. S., Jolley, K. A., Sparling, P. F., Saunders, N. J., Hart, C. A., Feavers, I. M. & Maiden, M. C. (2007).** Species status of *Neisseria gonorrhoeae*: evolutionary and epidemiological inferences from multilocus sequence typing. *BMC Biol* **5**, 35.

**Bennett, J. S., Bentley, S. D., Vernikos, G. S., Quail, M. A., Cherevach, I., White, B., Parkhill, J. & Maiden, M. C. (2010).** Independent evolution of the core and accessory gene sets in the genus *Neisseria*: insights gained from the genome of *Neisseria lactamica* isolate 020-06. *BMC Genomics* **11**, 652.

**Booy, R., Habibi, P., Nadel, S., de Munter, C., Britto, J., Morrison, A. & Levin, M. (2001).** Reduction in case fatality rate from meningococcal disease associated with improved healthcare delivery. *Arch Dis Child* **85**, 386-390.

**Botha, P. (1988).** Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in southern Africa. *Lancet* **1**, 54.

**Bowler, L. D., Zhang, Q. Y., Riou, J. Y. & Spratt, B. G. (1994).** Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol* **176**, 333-337.

**Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Gaustad, P., Skulberg, A., Bruun, J. N., Halvorsen, S. & Sorensen, E. (1989).** Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* **159**, 195-204.

**Brown, E. M., Fisman, D. N., Drews, S. J., Dolman, S., Rawte, P., Brown, S. & Jamieson, F. (2010).** Epidemiology of invasive meningococcal disease with decreased susceptibility to penicillin in Ontario, Canada, 2000 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1016-1021.

**Cartwright, K. (1995).** Meningococcal carriage and disease. In *Meningococcal disease*. Edited by K. Cartwright. Chichester, England: John Wiley & Sons.

**Cartwright, K. A., Stuart, J. M., Jones, D. M. & Noah, N. D. (1987).** The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* **99**, 591-601.

**Caugant, D. A. (1998).** Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* **106**, 505-525.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008).** Emergence of fluoroquinolone-resistant *Neisseria meningitidis*--Minnesota and North Dakota, 2007-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**, 173-175.

**Chu, Y. W., Cheung, T. K., Tung, V., Tiu, F., Lo, J., Lam, R., Lai, R. & Wong, K. K. (2007).** A blood isolate of *Neisseria meningitidis* showing reduced susceptibility to quinolones in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents* **30**, 94-95.

**Claus, H., Maiden, M. C., Wilson, D. J., McCarthy, N. D., Jolley, K. A., Urwin, R., Hessler, F., Frosch, M. & Vogel, U. (2005).** Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* **191**, 1263-1271.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (2007).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In *Supplement M100-S17*. Wayne, PA, USA.

**Corso, A., Faccione, D., Miranda, M., Rodriguez, M., Regueira, M., Carranza, C., Vencina, C., Vazquez, J. A. & Galas, M. (2005).** Emergence of *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Argentina. *J Antimicrob Chemother* **55**, 596-597.



**Davidson, T., Rodland, E. A., Lagesen, K., Seeberg, E., Rognes, T. & Tonjum, T. (2004).** Biased distribution of DNA uptake sequences towards genome maintenance genes. *Nucleic Acids Res* **32**, 1050-1058.

**Denning, D. W. & Gill, S. S. (1991).** Neisseria lactamica meningitis following skull trauma. *Rev Infect Dis* **13**, 216-218.

**Edwards, M. S. & Baker, C. J. (1981).** Complications and sequelae of meningococcal infections in children. *J Pediatr* **99**, 540-545.

**Faruki, H. & Sparling, P. F. (1986).** Genetics of resistance in a non-beta-lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 856-860.

**Feil, E. J., Maiden, M. C., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1999).** The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of Neisseria meningitidis. *Mol Biol Evol* **16**, 1496-1502.

**Francis, F., Ramirez-Arcos, S., Salimnia, H., Victor, C. & Dillon, J. R. (2000).** Organization and transcription of the division cell wall (dcw) cluster in Neisseria gonorrhoeae. *Gene* **251**, 141-151.

**Galimand, M., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, J. Y. & Courvalin, P. (1998).** High-level chloramphenicol resistance in Neisseria meningitidis. *N Engl J Med* **339**, 868-874.

**Gold, R., Goldschneider, I., Lepow, M. L., Draper, T. F. & Randolph, M. (1978).** Carriage of Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in infants and children. *J Infect Dis* **137**, 112-121.

**Gold, R. (1987).** Clinical aspects of meningococcal disease. In *Evolution of meningococcal disease*, pp. 69-97. Edited by N. A. Vedros. Boca Raton, Fla: CRC Press.

**Goldacre, M. J., Roberts, S. E. & Yeates, D. (2003).** Case fatality rates for meningococcal disease in an English population, 1963-98: database study. *BMJ* **327**, 596-597.

**Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R. & Elseviers, M. (2005).** Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* **365**, 579-587.

**Gorringe, A. R. (2005).** Can Neisseria lactamica antigens provide an effective vaccine to prevent meningococcal disease? *Expert Rev Vaccines* **4**, 373-379.

**Gorringe, A. R., Taylor, S., Brookes, C. & other authors (2009).** Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane vesicles. *Clin Vaccine Immunol* **16**, 1113-1120.

**Greenberg, L. W. & Kleinerman, E. (1978).** *Neisseria lactamica* meningitis. *J Pediatr* **93**, 1061-1062.

**Guibourdenche, M., Popoff, M. Y. & Riou, J. Y. (1986).** Deoxyribonucleic acid relatedness among *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea* and "*Neisseria polysaccharea*". *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**, 177-185.

**Hanage, W. P., Fraser, C. & Spratt, B. G. (2005).** Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol* **3**, 6.

**Hanage, W. P., Fraser, C. & Spratt, B. G. (2006).** The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. *J Theor Biol* **239**, 210-219.

**Hansman, D. (1978).** Meningitis caused by *Neisseria lactamica*. *N Engl J Med* **299**, 491.

**Hauser, C., Aebi, S. & Muhlemann, K. (2004).** An internationally spread clone of *Streptococcus pneumoniae* evolves from low-level to higher-level penicillin resistance by uptake of penicillin-binding protein gene fragments from nonencapsulated pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3563-3566.

**Hoberman, A., Paradise, J. L., Rockette, H. E. & other authors (2011).** Treatment of acute otitis media in children under 2 years of age. *N Engl J Med* **364**, 105-115.

**Huson, D. H. (1998).** SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**, 68-73.

**Huson, D. H. & Bryant, D. (2006).** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**, 254-267.

**Jorgensen, J. H., Crawford, S. A. & Fiebelkorn, K. R. (2005).** Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 antimicrobial agents and characterization of resistance mechanisms affecting some agents. *J Clin Microbiol* **43**, 3162-3171.

**Kirsch, E. A., Barton, R. P., Kitchen, L. & Giroir, B. P. (1996).** Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 967-978; quiz 979.

**Klein, J. O. (2011).** Is acute otitis media a treatable disease? *N Engl J Med* **364**, 168-169.

**Lauer, B. A. & Fisher, C. E. (1976).** *Neisseria lactamica* meningitis. *Am J Dis Child* **130**, 198-199.

**Lujan, R., Zhang, Q. Y., Saez Nieto, J. A., Jones, D. M. & Spratt, B. G. (1991).** Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-

binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 300-304.

**Maiden, M. C. (1998).** Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**, S12-20.

**Maiden, M. C. (2008).** Population genomics: diversity and virulence in the Neisseria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 467-471.

**Manchanda, V. & Bhalla, P. (2006).** Emergence of non-ceftriaxone-susceptible Neisseria meningitidis in India. *J Clin Microbiol* **44**, 4290-4291.

**Nadel, S. & Kroll, J. S. (2007).** Diagnosis and management of meningococcal disease: the need for centralized care. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 71-83.

**Nicolas, P., Manchanda, V. & Bhalla, P. (2007).** Emergence of non-ceftriaxone-susceptible Neisseria meningitidis in India. *J Clin Microbiol* **45**, 1378; author reply 1378.

**Oberkötter, M. (2003).** Genetische Diversität der humanen kommensalen Bakterienart Neisseria lactamica in epidemiologisch verknüpften Gruppen. In *Medizinische Fakultät*. Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

**Oppenheim, B. A. (1997).** Antibiotic resistance in Neisseria meningitidis. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**, S98-101.

**Pecoul, B., Varaine, F., Keita, M., Soga, G., Djibo, A., Soula, G., Abdou, A., Etienne, J. & Rey, M. (1991).** Long-acting chloramphenicol versus intravenous ampicillin for treatment of bacterial meningitis. *Lancet* **338**, 862-866.

**Quagliarello, V. J. & Scheld, W. M. (1997).** Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med* **336**, 708-716.

**R Development Core Team (2010).** R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

**Raghunathan, P. L., Jones, J. D., Tiendrebeogo, S. R. & other authors (2006).** Predictors of immunity after a major serogroup W-135 meningococcal disease epidemic, Burkina Faso, 2002. *J Infect Dis* **193**, 607-616.

**Richter, S. S., Gordon, K. A., Rhomberg, P. R., Pfaller, M. A. & Jones, R. N. (2001).** Neisseria meningitidis with decreased susceptibility to penicillin: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, North America, 1998-99. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**, 83-88.

**Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S. & other authors (1999).** The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis* **180**, 1894-1901.

**Rosenstein, N. E. & Perkins, B. A. (2000).** Update on Haemophilus influenzae serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin North Am* **47**, 337-352, vi.

**Rosenstein, N. E., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Popovic, T. & Hughes, J. M. (2001).** Meningococcal disease. *N Engl J Med* **344**, 1378-1388.

**Sabuncu, E., David, J., Bernede-Bauduin, C., Pepin, S., Leroy, M., Boelle, P. Y., Watier, L. & Guillemot, D. (2009).** Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in France, 2002-2007. *PLoS Med* **6**, e1000084.

**Saez-Nieto, J. A., Lujan, R., Martinez-Suarez, J. V., Berron, S., Vazquez, J. A., Vinas, M. & Campos, J. (1990).** Neisseria lactamica and Neisseria polysaccharea as possible sources of meningococcal beta-lactam resistance by genetic transformation. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 2269-2272.

**Saez-Nieto, J. A., Lujan, R., Berron, S. & other authors (1992).** Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant Neisseria meningitidis in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin Infect Dis* **14**, 394-402.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

**Schröder, H., Günther, J., Kern, W. V. & Nink, K. (2003).** Solange sie noch wirken ... Analysen und Kommentare zum Antibiotikaverbrauch in Deutschland: WIdO Bonn/ Universität Freiburg.

**Schröder, H., Nink, K., Günther, J. & Kern, W. V. (2005).** Solange sie noch wirken ... Revisited: 2001-2004: WIdO Bonn.

**Shultz, T. R., Tapsall, J. W., White, P. A., Ryan, C. S., Lyras, D., Rood, J. I., Binotto, E. & Richardson, C. J. (2003).** Chloramphenicol-resistant Neisseria meningitidis containing catP isolated in Australia. *J Antimicrob Chemother* **52**, 856-859.

**Sibold, C., Henrichsen, J., Konig, A., Martin, C., Chalkley, L. & Hakenbeck, R. (1994).** Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive Streptococcus oralis. *Mol Microbiol* **12**, 1013-1023.

**Sim, R. J., Harrison, M. M., Moxon, E. R. & Tang, C. M. (2000).** Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* **356**, 1653-1654.

**Skoczynska, A., Alonso, J. M. & Taha, M. K. (2008).** Ciprofloxacin resistance in Neisseria meningitidis, France. *Emerg Infect Dis* **14**, 1322-1323.

**Spratt, B. G., Zhang, Q. Y., Jones, D. M., Hutchison, A., Brannigan, J. A. & Dowson, C. G. (1989).** Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8988-8992.

**Spratt, B. G., Bowler, L. D., Zhang, Q. Y., Zhou, J. & Smith, J. M. (1992).** Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. *J Mol Evol* **34**, 115-125.

**Stefanelli, P., Fazio, C., La Rosa, G., Marianelli, C., Muscillo, M. & Mastrantonio, P. (2001).** Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *J Antimicrob Chemother* **47**, 219-222.

**Stephens, D. S., Greenwood, B. & Brandtzaeg, P. (2007).** Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* **369**, 2196-2210.

**Strahilevitz, J., Adler, A., Smollan, G., Temper, V., Keller, N. & Block, C. (2008).** Serogroup A *Neisseria meningitidis* with reduced susceptibility to ciprofloxacin. *Emerg Infect Dis* **14**, 1667-1669.

**Sutcliffe, E. M., Jones, D. M., el-Sheikh, S. & Percival, A. (1988).** Penicillin-insensitive meningococci in the UK. *Lancet* **1**, 657-658.

**Taha, M. K., Zarantonelli, M. L., Neri, A., Enriquez, R., Vazquez, J. A. & Stefanelli, P. (2006).** Interlaboratory comparison of PCR-based methods for detection of penicillin G susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 887-892.

**Taha, M. K., Vazquez, J. A., Hong, E. & other authors (2007).** Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2784-2792.

**Taha, M. K., Thulin Hedberg, S., Szatanik, M. & other authors (2010).** Multicenter study for defining the breakpoint for rifampicin resistance in *Neisseria meningitidis* by *rpoB* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*.

**Tahtinen, P. A., Laine, M. K., Huovinen, P., Jalava, J., Ruuskanen, O. & Ruohola, A. (2011).** A placebo-controlled trial of antimicrobial treatment for acute otitis media. *N Engl J Med* **364**, 116-126.

**Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

**Tapsall, J. W., Shultz, T., Linnios, E. & other authors (2001).** Surveillance of antibiotic resistance in invasive isolates of *Neisseria meningitidis* in Australia 1994-1999. *Pathology* **33**, 359-361.

**Thulin, S., Olcen, P., Fredlund, H. & Unemo, M. (2006).** Total variation in the penA gene of *Neisseria meningitidis*: correlation between susceptibility to beta-lactam antibiotics and penA gene heterogeneity. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3317-3324.

**Treangen, T. J., Ambur, O. H., Tonjum, T. & Rocha, E. P. (2008).** The impact of the neisserial DNA uptake sequences on genome evolution and stability. *Genome Biol* **9**, R60.

**Turnidge, J., Kahlmeter, G. & Kronvall, G. (2006).** Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* **12**, 418-425.

**Van Esso, D., Fontanals, D., Uriz, S., Morera, M. A., Juncosa, T., Latorre, C. & Duran, M. (1987).** *Neisseria meningitidis* strains with decreased susceptibility to penicillin. *Pediatr Infect Dis J* **6**, 438-439.

**Vazquez, J. A. (2001).** The resistance of *Neisseria meningitidis* to the antimicrobial agents: an issue still in evolution. *Reviews in Medical Microbiology* **12**, 39-45.

**Vazquez, J. A. (2007).** Resistance testing of meningococci: the recommendations of the European Monitoring Group on Meningococci. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 97-100.

**Vazquez, J. A., Enriquez, R., Abad, R., Alcalá, B., Salcedo, C. & Arreaza, L. (2007).** Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? *FEMS Microbiol Rev* **31**, 64-70.

**Vogel, U., Elias, J. & Frosch, M. (2008).** *Neisseria meningitidis*. In *GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch*, pp. 60-61. Edited by Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Infektiologie Freiburg. Rheinbach, Germany.

**Vogel, U., Elias, J., Claus, H. & Frosch, M. (2009).** Laboratory diagnostics of *Neisseria meningitidis* from the viewpoint of the German Reference Laboratory for Meningococci. *Journal Lab Medicine* **33**, 245-253.

**Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. & Barton, G. J. (2009).** Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.

**World Health Organization (2007).** Standardized treatment of bacterial meningitis in Africa in epidemic and non epidemic situations. Epidemic and pandemic alert and response. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

**Yagupsky, P., Ashkenazi, S. & Block, C. (1993).** Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease and failure of chemoprophylaxis. *Lancet* **341**, 1152-1153.

**Zhang, Q. Y., Jones, D. M., Saez Nieto, J. A., Perez Trallero, E. & Spratt, B. G. (1990).** Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1523-1528.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Prävalenz des Trägertums von <i>N. meningitidis</i> und <i>N. lactamica</i> in verschiedenen Altersgruppen	-2-
<b>Abb. 2:</b>	Schematische Darstellung des <i>penA</i> -Gens	-8-
<b>Abb. 3:</b>	Boxplots der MIC-Werte von <i>N. meningitidis</i> und <i>N. lactamica</i> , bestimmt mittels Penicillin G Etest.	-26-
<b>Abb. 4:</b>	MIC-Werte bei <i>N. lactamica</i> und <i>N. meningitidis</i>	-26-
<b>Abb. 5:</b>	Boxplots der MIC-Werte bei männlichen und weiblichen <i>N. lactamica</i> -Trägern	-27-
<b>Abb. 6:</b>	Streudiagramm, das die logarithmierten MIC-Werte in Abhängigkeit vom Alter des <i>N. lactamica</i> -Trägers darstellt	-28-
<b>Abb. 7:</b>	Karte des Freistaates Bayern mit den Erhebungsorten der bayerischen Meningokokkenträgerstudie	-30-
<b>Abb. 8:</b>	<i>penA</i> -Polymorphismen bei <i>N. meningitidis</i>	-32-
<b>Abb. 9:</b>	Boxplots der MIC-Werte der <i>N. meningitidis</i> -Stämme mit 0/5-Polymorphismus und mit 5/5-Polymorphismus	-32-
<b>Abb. 10:</b>	<i>penA</i> -Polymorphismen bei <i>N. lactamica</i>	-33-
<b>Abb. 11:</b>	MIC-Werte der verschiedenen Genotypen bei <i>N. lactamica</i>	-35-
<b>Abb. 12:</b>	Boxplots der MIC-Werte der <i>N. lactamica</i> -Stämme mit 3/5-Polymorphismus und der <i>N. lactamica</i> -Stämme mit 5/5-Polymorphismus	-35-
<b>Abb. 13:</b>	Boxplots der MIC-Werte der <i>N. meningitidis</i> -Stämme mit 5/5-Polymorphismus, der <i>N. lactamica</i> -Stämme mit 5/5-Polymorphismus und der <i>N. lactamica</i> -Stämme mit 3/5-Polymorphismus	-37-
<b>Abb. 14:</b>	<i>Split decomposition</i> -Darstellung aller <i>penA</i> -Allele dieser Studie zusammen mit allen <i>penA</i> -Allelen der <i>penA</i> -Datenbank	-38-
<b>Abb. 15:</b>	<i>Neighbour joining tree</i> aller im Rahmen dieser Studie vorkommenden <i>penA</i> -Allele	-39-
<b>Abb. 16:</b>	Phänotypische Ergebnisse der Transformation von $\alpha 14$ mit chromosomaler DNA aus <i>N. meningitidis</i> mit 5/5-Polymorphismus-Allel	-42-



<b>Abb. 17:</b>	Phänotypische Ergebnisse der Transformation von $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 5/5-Polymorphismus-Allel	<b>-44-</b>
<b>Abb. 18:</b>	Phänotypische Ergebnisse der Transformation von $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 3/5-Polymorphismus-Allel	<b>-45-</b>
<b>Abb. 19:</b>	Phänotypische Analyse der Transformationsexperimente	<b>-46-</b>
<b>Abb. 20:</b>	Darstellung des möglichen horizontalen Gentransfers von 5/5-Polymorphismus-Allelen von <i>N. lactamica</i> 5/5 auf <i>N. meningitidis</i> 0/5 unter Selektionsdruck in Form von Antibiotika	<b>-51-</b>

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Primer, die für die Analyse der Transpeptidaseregion des <i>penA</i> -Gens verwendet wurden	<b>-14-</b>
<b>Tabelle 2:</b>	Etest-Ergebnisse bei <i>N. meningitidis</i> und <i>N. lactamica</i> .	<b>-25-</b>
<b>Tabelle 3:</b>	Ergebnisse der Bonferroni-korrigierten Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich der MIC-Werte der Stadt Augsburg mit allen anderen Städten	<b>-29-</b>
<b>Tabelle 4:</b>	Etest-Ergebnisse bei <i>N. meningitidis</i> in Abhängigkeit vom <i>penA</i> -Polymorphismus	<b>-32-</b>
<b>Tabelle 5:</b>	Etest-Ergebnisse bei <i>N. lactamica</i> in Abhängigkeit vom <i>penA</i> -Polymorphismus	<b>-34-</b>
<b>Tabelle 6:</b>	Zusammenhang zwischen MIC-Werten und Anteil von 5/5 Polymorphismus-Allelen in den verschiedenen Städten	<b>-36-</b>
<b>Tabelle 7:</b>	Phänotypische und genotypische Charakteristika des Rezipientenstammes und der DNA-Donorstämme	<b>-41-</b>
<b>Tabelle 8:</b>	Transformation von $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus Meningokokken mit 5/5-Polymorphismus-Allel	<b>-42-</b>
<b>Tabelle 9:</b>	Transformation von $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 5/5-Polymorphismus-Allel	<b>-43-</b>
<b>Tabelle 10:</b>	Transformation von $\alpha$ 14 mit chromosomaler DNA aus <i>N. lactamica</i> mit 3/5-Polymorphismus-Allel	<b>-45-</b>

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cnl	Capsule null locus
DDD	<i>Defined daily dosis</i>
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DUS	<i>DNA-Uptake</i> -Sequenzen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOS	Fachoberschule
g	Gramm
GC-Agar	Gonokokken-Agar
h	Stunde
IHM	Institut für Hygiene und Mikrobiologie
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Meter, männlich
M	molar
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
min	Minuten
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

- Verzeichnisse -

<b>mM</b>	minimolar
<i>N. lactamica</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<b>NRZM</b>	Nationales Referenzzentrum für Meningokokken
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>pH</b>	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<b>PPM</b>	Proteose-Pepton-Medium
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>sec</b>	Sekunden
<i>spp.</i>	Spezies pluralis
<b>ST</b>	Sequenztyp
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Schmelztemperatur
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>V</b>	Volt
<b>w</b>	weiblich
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## 7. Anhang

### 7.1 Untersuchte *N. lactamica*-Stämme dieser Studie

Stamm- Nummer ( $\beta$ )	Stadt	Alter	Geschlecht	Institution	<i>penA</i> - Allel	AS- Austausch	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
2	Griesbach	14	m	Hauptschule	262	3/5	0,19
4	Griesbach	11	m	Hauptschule	225	3/5	0,38
5	Griesbach	11	w	Hauptschule	214	3/5	0,094
6	Griesbach	12	w	Hauptschule	214	3/5	0,125
7	Griesbach	13	m	Hauptschule	213	5/5	0,38
10	Pfarrkirchen	6	w	Grundschule	225	3/5	0,064
11	Pfarrkirchen	6	m	Grundschule	222	3/5	0,094
13	Pfarrkirchen	10	m	Grundschule	215	5/5	0,5
14	Pfarrkirchen	9	m	Grundschule	234	3/5	0,064
16	Pfarrkirchen	4	m	Kindergarten	225	3/5	0,125
18	Pfarrkirchen	6	m	Kindergarten	216	5/5	0,5
20	Pfarrkirchen	5	w	Kindergarten	242	3/5	0,19
21	Pfarrkirchen	6	w	Kindergarten	222	3/5	0,19
22	Pfarrkirchen	18	m	Gymnasium	263	3/5	0,19
23	Pfarrkirchen	11	w	Hauptschule	194	5/5	0,75
24	Pfarrkirchen	12	w	Hauptschule	217	5/5	0,38
26	Griesbach	4	w	Kindergarten	218	5/5	0,5
27	Griesbach	5	w	Kindergarten	219	5/5	0,38
29	Griesbach	6	m	Kindergarten	220	5/5	0,38
30	Griesbach	6	w	Kindergarten	221	5/5	0,38
31	Griesbach	5	m	Kindergarten	222	3/5	0,125
33	Griesbach	4	w	Kindergarten	223	5/5	0,75
35	Griesbach	4	m	Kindergarten	224	3/5	0,094
37	Griesbach	3	m	Kindergarten	222	3/5	0,094
38	Griesbach	5	w	Kindergarten	9	5/5	0,125
39	Erlangen	6	m	Grundschule	225	3/5	0,094
42	Erlangen	6	m	Kindergarten	228	5/5	0,5
47	Erlangen	3	w	Kindergarten	226	5/5	0,75
50	Erlangen	4	m	Kindergarten	9	5/5	0,5
53	Erlangen	4	m	Kindergarten	222	3/5	0,094
54	Erlangen	-	-	Kindergarten	9	5/5	0,75
57	Erlangen	3	m	Kindergarten	8	5/5	0,5
61	Erlangen	6	m	Grundschule	9	5/5	0,5
68	Erlangen	9	m	Grundschule	236	3/5	0,19
71	Erlangen	10	m	Grundschule	227	5/5	0,38
74	Erlangen	10	w	Grundschule	236	3/5	0,19
78	Erlangen	7	w	Grundschule	236	3/5	0,25
92	Erlangen	11	m	Hauptschule	9	5/5	0,75
98	Erlangen	3	w	Kindergarten	192	5/5	0,75
101	Erlangen	8	m	Grundschule	258	3/5	0,19
105	Erlangen	14	w	Hauptschule	228	5/5	0,75
106	Erlangen	15	w	Hauptschule	234	3/5	0,38
107	Erlangen	12	w	Realschule	259	5/5	0,75
108	Erlangen	17	m	Gymnasium	224	3/5	0,125

- Anhang -

109	Ansbach	6	m	Grundschule	9	5/5	0,5
111	Ansbach	6	w	Grundschule	233	3/5	0,094
112	Ansbach	6	w	Grundschule	233	3/5	0,125
113	Ansbach	8	w	Grundschule	229	5/5	0,75
114	Ansbach	5	w	Kindergarten	224	3/5	0,125
116	Ansbach	4	m	Kindergarten	214	3/5	0,25
117	Ansbach	5	m	Kindergarten	230	3/5	0,19
119	Ansbach	11	w	Hauptschule	231	5/5	0,38
120	Ansbach	10	w	Hauptschule	263	3/5	0,094
123	Ansbach	10	w	Grundschule	9	5/5	0,38
124	Ansbach	7	m	Grundschule	232	5/5	0,5
126	Ansbach	5	w	Kindergarten	233	3/5	0,125
127	Ansbach	3	w	Kindergarten	233	3/5	0,125
128	Ansbach	5	w	Kindergarten	233	3/5	0,094
129	Ansbach	4	w	Kindergarten	251	5/5	1
130	Ansbach	12	w	Hauptschule	234	3/5	0,19
131	Weiden	9	m	Grundschule	214	3/5	0,19
133	Weiden	3	w	Kindergarten	9	5/5	0,38
135	Weiden	6	w	Kindergarten	235	0/5	0,25
137	Weiden	4	w	Kindergarten	235	0/5	0,38
138	Weiden	4	m	Kindergarten	225	3/5	0,125
141	Weiden	5	w	Kindergarten	236	3/5	0,19
143	Weiden	4	m	Kindergarten	58	5/5	0,5
147	Augsburg	7	w	Grundschule	237	5/5	0,38
149	Augsburg	7	m	Grundschule	260	5/5	1
151	Augsburg	6	w	Grundschule	261	5/5	0,25
154	Augsburg	8	w	Grundschule	238	5/5	0,5
155	Augsburg	9	-	Grundschule	239	5/5	0,5
156	Augsburg	8	m	Grundschule	236	3/5	0,19
158	Augsburg	10	m	Grundschule	233	3/5	0,125
159	Augsburg	11	m	Grundschule	240	5/5	2
162	Augsburg	10	w	Grundschule	241	5/5	0,38
163	Augsburg	10	w	Grundschule	242	3/5	0,19
168	Augsburg	13	w	Realschule	243	5/5	0,75
169	Augsburg	6	w	Kindergarten	244	3/5	0,25
173	Augsburg	4	m	Kindergarten	9	5/5	0,75
174	Augsburg	4	w	Kindergarten	9	5/5	1,5
175	Augsburg	4	m	Kindergarten	110	5/5	0,75
176	Augsburg	4	m	Kindergarten	110	5/5	0,75
177	Augsburg	5	w	Kindergarten	110	5/5	0,5
178	Augsburg	4	m	Kindergarten	8	5/5	0,5
179	Augsburg	4	m	Kindergarten	245	5/5	1
181	Augsburg	5	-	Kindergarten	110	5/5	0,75
183	Augsburg	5	m	Kindergarten	243	5/5	0,75
185	Augsburg	3	m	Kindergarten	43	5/5	0,75
192	Ingolstadt	7	m	Grundschule	246	3/5	0,125
200	Ingolstadt	5	w	Kindergarten	214	3/5	0,19
201	Ingolstadt	3	m	Kindergarten	214	3/5	0,25
205	Ingolstadt	3	m	Kindergarten	242	3/5	0,25
206	Ingolstadt	4	m	Kindergarten	224	3/5	0,125

- Anhang -

207	Ingolstadt	4	w	Kindergarten	224	3/5	0,125
208	Ingolstadt	-	-	Kindergarten	242	3/5	0,125
209	Ingolstadt	4	w	Kindergarten	248	5/5	0,5
210	Ingolstadt	3	w	Kindergarten	242	3/5	0,38
211	Ingolstadt	12	w	Hauptschule	31	5/5	0,75
214	Ingolstadt	11	w	Hauptschule	247	5/5	1
225	Ingolstadt	21	m	Fachoberschule	248	5/5	0,75
226	Ingolstadt	19	w	Fachoberschule	233	3/5	0,094
227	Ingolstadt	6	m	Kindergarten	234	3/5	0,064
228	Ingolstadt	5	w	Kindergarten	214	3/5	0,094
234	Sonthofen	7	w	Grundschule	195	5/5	1
235	Sonthofen	5	m	Kindergarten	248	5/5	0,25
250	München	13	w	Hauptschule	233	3/5	0,125
251	München	14	m	Hauptschule	249	4/5	0,25
254	München	10	m	Hauptschule	250	5/5	1,5
256	München	14	w	Hauptschule	9	5/5	0,5
259	München	8	m	Grundschule	252	5/5	0,38
265	München	4	m	Kindergarten	224	3/5	0,125
267	München	5	w	Kindergarten	251	5/5	0,75
269	München	3	m	Kindergarten	252	5/5	0,5
270	München	3	m	Kindergarten	253	5/5	0,19
271	München	5	w	Kindergarten	234	3/5	0,25
273	München	5	w	Kindergarten	233	3/5	0,125
289	München	6	w	Kindergarten	234	3/5	0,094
291	München	5	m	Kindergarten	254	5/5	0,38
298	München	4	m	Kindergarten	255	5/5	0,25
301	München	11	m	Hauptschule	256	5/5	0,25
302	München	12	m	Hauptschule	257	5/5	0,5
306	München	3	m	Kindergarten	233	3/5	0,125

## 7.2 Untersuchte *N. meningitidis*-Stämme dieser Studie

Stammnummer (DE)	Serogruppe	<i>porA</i> VR1	<i>porA</i> VR2	<i>fetA</i>	<i>penA</i> -Allel	AS-Austausch	MIC (µg/ml)
10444	Y	5-1	2-2	5-8	22	0/5	0,094
10445	Y	5-1	2-2	5-8	22	0/5	0,125
10453	B	17	9	1-7	38	0/5	0,032
10454	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,047
10455	B	17	16-3	5-5	1	0/5	0,047
10456	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10457	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10458	B	18-1	30	3-7	1	0/5	0,064
10459	B	7-2	4	5-1	3	0/5	0,047
10460	C	7-2	4	5-1	3	0/5	0,032
10461	B	7-2	10	4-3	1	0/5	0,047
10462	C	22	14	3-3	1	0/5	0,064
10463	B	7	16	3-3	3	0/5	0,064
10465	B	7	16	3-3	3	0/5	0,094
10466	C	5-1	10-8	3-6	3	0/5	0,032

- Anhang -

10541	C	5-1	10-55	3-6	3	0/5	0,064
10542	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,064
10544	B	22	14-6	1-5	1	0/5	0,064
10545	C	5-1	10-8	3-6	3	0/5	0,064
10546	B	5-1	10-1	1-20	3	0/5	0,032
10547	W135	5	2	4-1	14	5/5	0,125
10548	B	12-1	16-8	1-7	1	0/5	0,047
10549	B	19	15	5-1	52	5/5	0,125
10550	C	5	2	3-3	3	0/5	0,064
10551	Y	5-2	10-1	4-1	22	0/5	0,064
10552	C	5-1	10-8	4-1	3	0/5	0,047
10553	C	5-1	10-8	4-1	3	0/5	0,064
10554	B	7	15	3-3	3	0/5	0,064
10555	C	5	2	3-3	1	0/5	0,047
10556	C	18-1	3	3-9	22	0/5	0,032
10557	B	7	16	3-3	1	0/5	0,047
10558	C	5	2	3-3	3	0/5	0,064
10559	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10560	C	7	16	3-3	3	0/5	0,064
10561	B	22	9	5-12	3	0/5	0,047
10563	C	7	16	3-3	3	0/5	0,064
10564	Y	22	9	3-7	1	0/5	0,064
10565	B	21	16	1-14	5	0/5	0,032
10566	C	5	2	3-3	1	0/5	0,094
10567	B	17	16-4	3-9	1	0/5	0,032
10568	B	22	14	5-5	5	0/5	0,064
10569	B	5-1	10-13	2-9	5	0/5	0,047
10570	C	5	2	3-3	1	0/5	0,094
10571	B	18	25-1	5-1	27	0/5	0,047
10572	W135	18-1	3	3-12	4	0/5	0,064
10574	B	7-2	4	5-1	3	0/5	0,064
10575	C	18-1	3	3-9	1	0/5	0,016
10576	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,064
10577	B	19	15-1	1-5	1	0/5	0,032
10578	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10579	B	7-2	4	2-5	1	0/5	0,064
10580	B	5-1	2-2	1-7	1	0/5	0,032
10581	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,064
10582	Y	5-2	10-1	4-1	1	0/5	0,064
10583	C	5-1	10-55	3-6	3	0/5	0,064
10584	B	7	30	3-3	1	0/5	0,047
10585	B	12-1	13-1	1-5	1	0/5	0,047
10586	B	7-2	4	1-7	1	0/5	0,094
10587	C	5	2	3-6	3	0/5	0,064
10588	B	7-11	16	3-3	3	0/5	0,064
10590	B	18-1	30-8	5-2	1	0/5	0,047
10591	C	5	2	3-3	1	0/5	0,094
10593	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10594	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10595	X	21	16	5-5	3	0/5	0,047



- Anhang -

10596	B	7-2	16	3-3	3	0/5	0,047
10597	Y	5-2	10-1	4-1	22	0/5	0,064
10598	C	5	2	3-3	1	0/5	0,047
10599	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,047
10600	C	18-1	3	3-9	22	0/5	0,032
10601	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,047
10602	B	7-4	2-34	1-5	1	0/5	0,047
10603	B	22	14	1-20	5	0/5	0,19
10606	B	18-1	3	1-5	5	0/5	0,047
10607	B	12-1	13-1	3-9	3	0/5	0,094
10608	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,047
10609	B	19-1	15-11	1-7	27	0/5	0,032
10610	B	22	14	5-5	34	0/5	0,047
10611	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10612	B	7-2	4	5-1	3	0/5	0,047
10613	Y	5-2	10-1	4-1	22	0/5	0,064
10614	C	5	2	3-3	3	0/5	0,064
10615	B	12-1	4	5-2	5	0/5	0,094
10616	W135	18-1	3	4-1	14	5/5	0,125
10617	B	7-2	13-2	1-5	1	0/5	0,047
10618	B	22	26	3-1	1	0/5	0,047
10619	W135	5	2	5-8	77	5/5	0,25
10620	B	22-1	14	4-1	154	0/5	0,064
10621	C	21	16	5-5	22	0/5	0,047
10622	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,064
10623	B	5-2	10	5-1	3	0/5	0,016
10624	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10625	B	18-1	3	1-7	1	0/5	0,047
10626	B	18	25-1	5-1	27	0/5	0,047
10627	Y	21	16	3-7	9	5/5	0,25
10628	B	22	14	5-5	34	0/5	0,125
10629	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10630	C	7-4	14-6	3-9	22	0/5	0,047
10631	B	12-1	13-9	1-5	1	0/5	0,064
10634	B	18-1	3	5-1	3	0/5	0,047
10635	B	22	14-6	5-3	110	5/5	0,19
10636	W135	5	2	1-14	1	0/5	0,064
10637	Y	5-1	10-4	4-1	22	0/5	0,094
10638	B	7-1	4	5-5	3	0/5	0,064
10639	B	22	14-6	5-2	3	0/5	0,064
10640	C	5-1	10-55	3-6	3	0/5	0,064
10641	B	7	16	3-3	3	0/5	0,047
10642	B	21	16	5-1	2	0/5	0,064
10643	B	5-2	10	5-8	78	5/5	0,19
10644	B	22	14	5-5	5	0/5	0,047
10645	Y	5-1	10-4	4-1	2	0/5	0,094
10646	B	7-2	4	5-1	3	0/5	0,032
10647	C	5-1	10-22	5-9	1	0/5	0,064
10648	B	7-2	4	1-5	1	0/5	0,064
10649	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064

- Anhang -

10650	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10651	B	7-2	16	3-3	3	0/5	0,064
10652	B	22	9	5-1	27	0/5	0,064
10653	B	12-1	4	5-2	5	0/5	0,125
10654	C	5	2	3-6	3	0/5	0,064
10655	B	7-2	16	3-3	3	0/5	0,064
10656	Y	5-2	10-1	4-1	22	0/5	0,125
10657	C	18-1	3	3-9	22	0/5	0,047
10659	C	5	2	3-3	1	0/5	0,064
10660	B	22	9	5-12	34	0/5	0,047
10661	B	22	14-6	3-3	3	0/5	0,032
10662	Y	5-2	10-1	4-1	22	0/5	0,064
10663	B	7	16	5-99	3	0/5	0,047
10664	C	5	2	3-3	1	0/5	0,032

**7.3 Im Rahmen der Transformationsversuche eingesetzte *N. meningitidis*-Stämme**

Stammnummer (DE)	Serogruppe	Sequenztyp	<i>porA</i> VR1	<i>porA</i> VR2	<i>fetA</i>	<i>penA</i>	MIC (µg/ml)
α14	unbekapselt (cni)	ST-53	7	30-3	5-5	2	0,047
10490	B	unbekannt	5-1	10-4	5-12	146	0,094
10514	B	unbekannt	22	14	1-5	7	0,125
10549	B	ST-749	19	15	5-1	52	0,125
10694	B	unbekannt	12-1	13-1	5-37	13	0,25

#### 7.4 Ergebnisse der paarweisen Bonferroni-korrigierten Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich der MIC-Werte in verschiedenen Städten

Stichprobe1-Stichprobe2	Teststatistik	Standardfehler	Standard Teststatistik	Sig.	Anpassungsig.
Pfarrkirchen-Griesbach	2,364	14,014	,169	,866	1,000
Pfarrkirchen-Ansbach	3,520	13,623	,258	,796	1,000
Pfarrkirchen-Ingolstadt	5,649	14,014	,403	,687	1,000
Pfarrkirchen-Weiden	-8,935	16,817	-,531	,595	1,000
Pfarrkirchen-München	11,981	13,459	,890	,373	1,000
Pfarrkirchen-Erlangen	22,058	13,312	1,657	,098	1,000
Pfarrkirchen-Sonthofen	-39,114	26,738	-1,463	,144	1,000
Pfarrkirchen-Augsburg	40,386	12,844	3,144	,002	,060
Griesbach-Ansbach	1,156	12,729	,091	,928	1,000
Griesbach-Ingolstadt	-3,286	13,147	-,250	,803	1,000
Griesbach-Weiden	-6,571	16,101	-,408	,683	1,000
Griesbach-München	-9,618	12,553	-,766	,444	1,000
Griesbach-Erlangen	19,694	12,395	1,589	,112	1,000
Griesbach-Sonthofen	-36,750	26,293	-1,398	,162	1,000
Griesbach-Augsburg	38,023	11,892	3,197	,001	,050
Ansbach-Ingolstadt	-2,129	12,729	-,167	,867	1,000
Ansbach-Weiden	-5,415	15,762	-,344	,731	1,000
Ansbach-München	-8,461	12,115	-,698	,485	1,000
Ansbach-Erlangen	-18,538	11,951	-1,551	,121	1,000

- Anhang -

<b>Ansbach-Sonthofen</b>	-35,594	26,087	-1,364	,172	1,000
<b>Ansbach-Augsburg</b>	-36,866	11,428	-3,226	,001	,045
<b>Ingolstadt-Weiden</b>	-3,286	16,101	-,204	,838	1,000
<b>Ingolstadt-München</b>	-6,332	12,553	-,504	,614	1,000
<b>Ingolstadt-Erlangen</b>	16,409	12,395	1,324	,186	1,000
<b>Ingolstadt-Sonthofen</b>	-33,464	26,293	-1,273	,203	1,000
<b>Ingolstadt-Augsburg</b>	34,737	11,892	2,921	,003	,126
<b>Weiden-München</b>	3,046	15,620	,195	,845	1,000
<b>Weiden-Erlangen</b>	13,123	15,493	,847	,397	1,000
<b>Weiden-Sonthofen</b>	30,179	27,888	1,082	,279	1,000
<b>Weiden-Augsburg</b>	31,451	15,094	2,084	,037	1,000
<b>München-Erlangen</b>	10,077	11,763	,857	,392	1,000
<b>München-Sonthofen</b>	-27,132	26,002	-1,043	,297	1,000
<b>München-Augsburg</b>	28,405	11,232	2,529	,011	,412
<b>Erlangen-Sonthofen</b>	-17,056	25,925	-,658	,511	1,000
<b>Erlangen-Augsburg</b>	18,328	11,055	1,658	,097	1,000
<b>Sonthofen-Augsburg</b>	1,273	25,689	,050	,960	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

## 8. Danksagung

Zum Schluss dürfen diejenigen nicht unerwähnt bleiben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ulrich Vogel, der mir das Thema maßgeschneidert hat, mich über die letzten vier Jahre hinweg hervorragend betreut hat, mir meine ersten wissenschaftlichen Schritte ermöglicht hat und mich nicht zuletzt für die Epidemiologie begeistert hat. Für all dies – und vieles mehr – möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Heike Claus, die nicht nur alles weiß und alles kann, sondern auch immer bereit war mit grenzenloser Geduld ihr Wissen und Können zu teilen. Ihre Bedeutung für diese Arbeit, unsere Arbeitsgruppe und das ganze Institut kann nicht hoch genug eingeschätzt werden. Vielen Dank für die außergewöhnlich gute Betreuung und die interessanten Gespräche!

Tessa van Alen, Sabine Schulz und Evelyn Spachholz gebührt besonderer Dank dafür, dass die Zeit im Labor für mich mehr als Arbeit geworden ist. Martin Lappann – meinem „Banknachbarn“ – sei außerdem dafür gedankt, dass mein Chaos auf unserer Bench nicht allzu sehr aufgefallen ist.

Christine Meinhardt, Kerstin Hubert, Isabell Kaluza, Ines Mordhorst, Johannes Elias, Markus Jördens und Fabian Spielmann möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das schöne Arbeitsklima danken.

Dem „Großraumlabor“ sei herzlich dafür gedankt, meine rekurrenten Störungen mit Gleichmut zu ertragen und mir immer wieder das Passwort für den *NanoDrop* zu verraten.

Den netten Bauarbeitern, die unser Labor überfluteten, sei dafür gedankt, dass dies am zweiten Tag meines Schaffens geschah und die Schäden an meinem Laborbuch dementsprechend gering ausfielen.

Priv.-Doz. Dr. med. Nurcan Üçeyler danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und ihr erfolgreiches Bemühen, meine Begeisterung für die Neurologie weiter zu verstärken.

Abschließend möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Matthias Frosch ganz herzlich dafür bedanken, meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu dürfen.