

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer**

**Molekularepidemiologische Charakterisierung  
der BRO- $\beta$ -Laktamasen europäischer *Moraxella catarrhalis* Isolate und Analyse  
der In-vitro-Aktivität verschiedener Antibiotika**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Andreas Beeck

**2003**

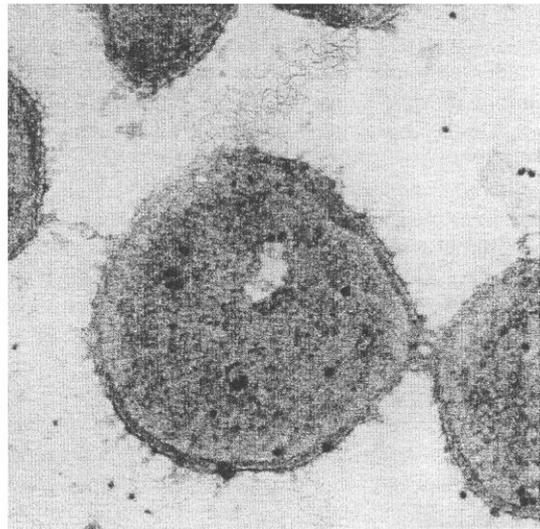
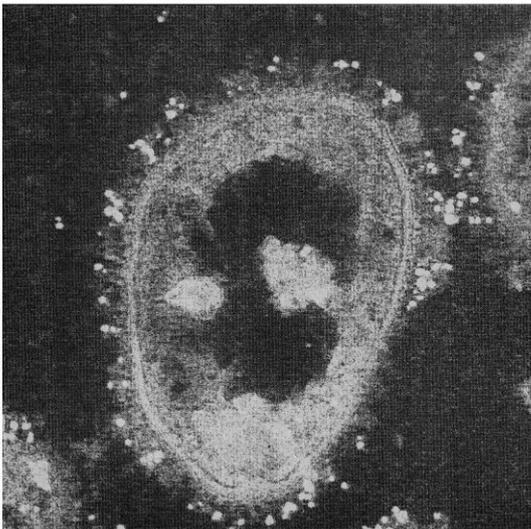
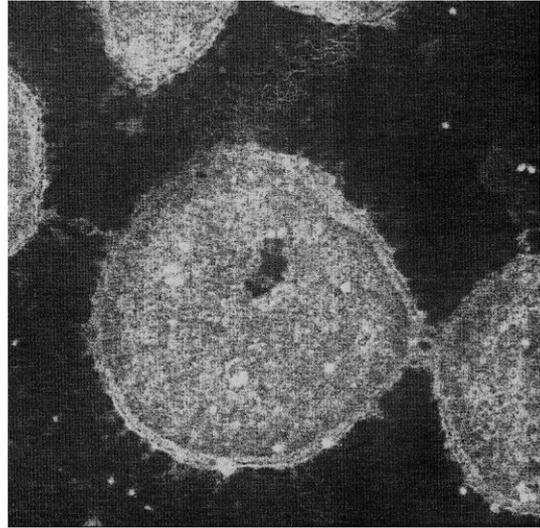
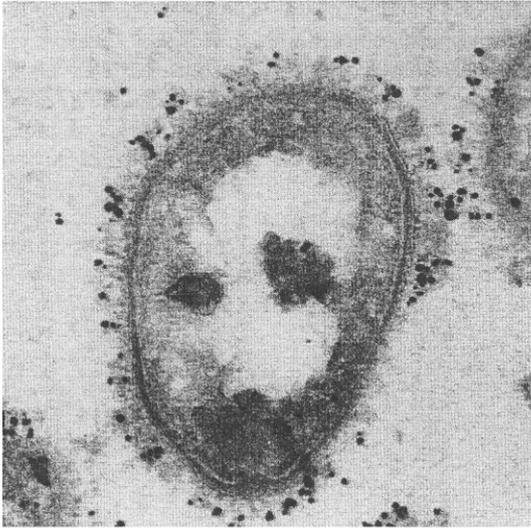
Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz, Ph. D.

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Helga Idel



*Bildnachweis:*  
(Verduin, Hol et al. 2002) *Komplement-sensible (re.)*  
*und Komplement-resistente Moraxella catarrhalis in Bindung an Vitronektin.*

## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	B	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Amox	Amoxicillin
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat-Lösung
Bp	Basenpaar(e)
Clav	Clavulansäure
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H. influenza	Hämophilus influenza
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Kb	Kilobase(n)

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHK	Minimale Hemmkonzentration
Mill.	Milliarde(n)
Mio.	Million(en)
M. catarrhalis	Moraxella catarrhalis
M. lacunata	Moraxella lacunata
M. nonliquefaciens	Moraxella nonliquefaciens
NCCL	National Committee for Clinical Laboratory Standards
N. cinera	Neisseria cinera
N. gonorrhoeae	Neisseria gonorrhoeae
N. meningitidis	Neisseria meningitidis
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gel-Elektrophorese
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
spp.	Spezies
SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
TEMED	N,N,N', N'-tetramethylethylenediamine

## Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1 Fragestellung.....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
2.1 Bakterien .....	19
2.2 Chemikalien.....	19
2.2.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen.....	19
2.2.2 Antibiotika.....	21
2.2.3 Testblättchen.....	22
2.2.4 Kits .....	22
2.3 Primer (Gibco BGL).....	22
2.4 Nährmedien.....	23
2.5 Apparaturen.....	23
2.6 Untersuchungsmethoden.....	24
2.6.1 Bakterienkonservierung.....	24
2.6.2 Sterilisation.....	24
2.6.3 Messung der optischen Dichte .....	25
2.6.4 Bestimmung der MHK .....	25
2.6.5 Agardiffusionstest.....	26
2.6.6 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion .....	28
2.6.8 Aufreinigung .....	31
2.6.9 Sequenzierreaktion.....	32
2.6.10 Fällung .....	33
2.6.11 Sequenzierung.....	34
2.6.12 Bestimmung der Komplement-Resistenz .....	35

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
3.1	β-Laktamase-Aktivität .....	37
3.2	Sequenzen und Mutationen .....	38
3.3	In-vitro-Aktivität der getesteten Antibiotika .....	39
3.4	Komplement-Resistenz.....	41
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>42</b>
4.1	β-Laktamase-Aktivität .....	42
4.2	Sequenzen und Mutationen .....	44
4.3	In-vitro-Aktivität der getesteten Antibiotika .....	48
4.4	Komplement-Resistenz.....	51
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>71</b>
7.1	Abbildungen.....	71
7.2	Tabellen .....	77

## 1 Einleitung

*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* galt lange Zeit als harmloser Kommensale des Respirationstraktes. Die Auffassung von *M. catarrhalis* als humanpathogene Spezies kommt der Wiederentdeckung eines vormals kaum beachteten Organismus gleich (Enright and McKenzie 1997). Diese Auffassung, obschon keineswegs neu, hat sich erst wieder in den letzten 20 bis 30 Jahren durchsetzen können.

Berk (Berk 1990) beschreibt wie der Keim, obwohl wahrscheinlich schon 14 Jahre vorher durch Seifert entdeckt, im Jahre 1896 nach Pfeiffer die Bezeichnung *Mikrokokkus catarrhalis* erfährt und durch Ghon und Pfeiffer 1902 neben *Streptococcus pneumoniae* und einem Organismus, der später *Haemophilus influenza* heißen sollte, eindeutig als Atemwegspathogen eingeordnet wird. Daran ändert sich auch 1905 noch nichts, als Dunn und Gordon eine Influenza-Epidemie in East Herfordshire untersuchen und drei verschiedene Arten von gram-negativen Kokken aus Sekreten des Respirationstraktes isolieren können, von denen *M. catarrhalis* sogar der häufigste war. Die Wende tritt 1921 mit einer Studie an gram-negativen Kokken bei der allgemeinen Erkältungskrankheit und der Influenza von Gordon ein. In der Studie wurde unglücklicherweise nicht zwischen *M. catarrhalis* und *Neisseria cinera*, einem Kommensalen des Respirationstraktes differenziert (Karalus and Campagnari 2000), mit der Folge, dass dem Keim seitdem jede Pathogenität abgesprochen worden ist. Diese Einschätzung überdauert die meiste Zeit des letzten Jahrhunderts, während derer viele klinische Labors vernachlässigen, Proben von Patienten mit respiratorischen Infekten auf die Anwesenheit von *M. catarrhalis* zu testen (Karalus and Campagnari 2000).

Das von Unklarheiten geprägte Bild des Organismus spiegelt sich auch in seiner Nomenklatur wieder.

1963 zeigt Berger, dass die ursprüngliche Gattung *Mikrokokkus catarrhalis* zwei verschiedene Spezies *Neisseria cinera* und *Neisseria catarrhalis* beinhaltet. Gestützt durch frühe DNA-DNA-Hybridisierungsstudien von 1970 und in Abgrenzung zu *Neisseriaceae spp.* schlägt Catlin (Catlin 1970) die Einführung einer neuen Gattung

der *Branhamella* vor. Im Folgenden zeigt sich mehr und mehr die Verwandtschaft zu *Moraxella* spp. was die Bezeichnung *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* von 1984 zum Ausdruck bringt. 1979 hatte Bovre eine Teilung der Gattung *Moraxella* in die Subgattungen *Moraxella* und *Branhamella* vorgeschlagen, 1991 schlägt Catlin die Einführung einer neuen Familie der *Branhamaceae* mit den Gattungen der *Moraxella* und *Branhamella* vor. Solche Versuche betonten die Trennung zwischen diplokokkoidem „*Branhamella*“ *catarrhalis* und stäbchenförmigen und zudem meist harmlosen *Moraxella* spp. (Murphy 1996). Heute scheint die taxonomische Diskussion gelöst (Verduin, Hol et al. 2002): Anhand von neueren DNA-DNA- (Veron, Lenvoise-Furet et al. 1993) und rRNA-DNA-Hybridisationen (Rossau, Van Landschoot et al. 1991) sowie durch den Vergleich von 16S-rDNA-Sequenzen (Enright, Carter et al. 1994; Pettersson, Kodjo et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* ausreichende Ähnlichkeit zu anderen *Moraxella* spp. besitzt und gewöhnliche Kriterien zur Einordnung in diese Gattung erfüllt. Mit dieser Auffassung wird die Bezeichnung *Moraxella catarrhalis* ungeachtet aller morphologischen Unterschiede favorisiert, dem in dieser Darstellung gefolgt wird.

Die Kolonien des aeroben, oxidase-positiven, gram-negativen Diplokokkus sind nach 48-stündiger Inkubation auf Blut- oder Kochblut-Agar etwa 2 mm groß, opak und zeigen keine Hämolyse. Charakteristischerweise lassen sie sich auf dem Agar wie ein Puck auf dem Eis mit einer Schlinge verschieben (Bovre 1984). Neben der morphologischen Ähnlichkeit zu *Neisseria* spp. lauern auch bei der Stoffwechselaktivität einige Fallstricke, die in der Geschichte des Keims zu beschriebenen Verwechslungen geführt haben. Wie bei *N. cinerea* werden die Zucker Saccharose, Glukose, Maltose und Laktose nicht metabolisiert. Zum sicheren Ausschluss von *Neisseria* spp. sind weitere Tests nötig: *M. catarrhalis* reduziert Nitrate und Nitrite, ist Desoxyribonuklease-Produzent (DNAse) und reagiert positiv im Superoxol-Test (Ahmad, Young et al. 1987). Alternativ wird zur Abgrenzung zu Neisserien die Fähigkeit von *M. catarrhalis* zur Hydrolyse von Tributyrin (Tributyryl-esterase positiv) in einem Schnelltest in der Routine-Diagnostik ausgenutzt (Riley 1987). Allerdings reagieren auch einige *Moraxella* spp. positiv, so dass hier DNAse oder Nitrat-Reduktionstests zusätzlich erforderlich sind (Peiris, Ralphson et al. 1993). Die Schwierigkeiten bei der Identifikation des Keims

erschweren zusätzlich die Interpretation älterer Studien, bei denen die Erkenntnisse über die Stoffwechselaktivitäten noch nicht berücksichtigt wurden (Enright and McKenzie 1997).

Die Arbeit der Forschung der letzten Jahre bestand zu einem wesentlichen Teil im Nachweis der Pathogenität von *M. catarrhalis*. Dabei waren für Murphy und Sethi (Murphy and Sethi 1992) über die Koinzidenz von Isolation des Keims aus einer Probe des Patienten und Krankheitszustand hinaus folgende Punkte zur Erhärtung der Kausalität wichtig: zunehmende Anzahl positiver Befunde in Sputumproben, die nach strengen Kriterien zur Prüfung auf Kontamination evaluiert wurden (McLeod, Ahmad et al. 1986; Nicotra, Rivera et al. 1986); zunehmende Anzahl positiver Befunde in Reinkulturen von transtrachealen Aspirationen (Ninane, Joly et al. 1978; Aitken and Thornley 1983; Hager, Verghese et al. 1987) sowie gelegentlich aus sterilen Kompartimenten wie Blut oder Pleuraflüssigkeit (Choo and Gantz 1989; Wallace and Oldfield 1990; Collazos, de Miguel et al. 1992); Ansprechen auf adäquate antibiotische Behandlung (McLeod, Ahmad et al. 1986; Nicotra, Rivera et al. 1986; Darelid, Lofgren et al. 1993) sowie eine bakterizide Antikörperantwort auf den homologen Stamm bei Patienten mit chronischer Bronchitis (Chapman, Musher et al. 1985). Inzwischen ist über die Zunahme an Fällen von Infektionen durch *M. catarrhalis* unabhängig von Veränderungen der Labortechnik oder Interpretationspraktik viel berichtet worden (Shurin, Marchant et al. 1983; Calder, Croughan et al. 1986; McLeod, Ahmad et al. 1986; Davies and Maesen 1988; Wright, Wallace et al. 1990; Chong, Lim et al. 1997), und die Liste der beschriebenen Krankheitsbilder zeugt von der klinischen Bedeutung des Keims.

Zu ihnen gehören an erster Stelle die Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes wie die Sinusitis, Otitis media, Laryngitis, Tracheitis, Bronchitis und Pneumonie (McGregor, Chang et al. 1998), ferner okuläre Infektionen bei Kindern (Verduin, Hol et al. 2002) und seltene ernsthafte Infektionen mit teilweise kritischem Verlauf (Karalus and Campagnari 2000).

Bei Kindern ist die Otitis media eine sehr häufige Erkrankung: 50% aller Einjährigen haben eine Episode durchgemacht, 70% sind es bei den Dreijährigen (Thoene and Johnson 1991). Zudem können rezidivierende Verläufe zu Schwerhörigkeit und konsekutiv Entwicklungsstörungen im Schulalter führen (Klein 1994; Klein 1994). *M.*

*catarrhalis* wird, wie verschiedene Studien zeigen, für 15-20% aller Fälle verantwortlich gemacht und steht damit nach *S. pneumoniae* und *H. influenzae* an dritter Stelle der Ursachenhäufigkeit (Enright and McKenzie 1997; McGregor, Chang et al. 1998; Karalus and Campagnari 2000). Unter diesen Voraussetzungen wird geschätzt, dass allein in den USA 3,4 Mio. Fälle von *M. catarrhalis* induzierter Otitis media pro Jahr auftreten, deren Behandlung neben indirekten Kosten für die Eltern 2 Mill. Dollar pro Jahr ausmacht (Stool and Field 1989; Klein 1994; Murphy 1996). Diese Zahlen dürften einen weiteren Aspekt „klinischer Bedeutung“ illustrieren.

Bei der Sinusitis zeigen sich ebenfalls die drei schon bekannten Pathogene des Respirationstraktes *S. pneumoniae*, *H. influenzae* und *M. catarrhalis*, die hier oft in Kombination isoliert werden. Die Gesamtisolationshäufigkeit von *M. catarrhalis* liegt bei 22%, die Reinkultur fand sich vor allem bei jüngeren Kindern (Wald, Milmoie et al. 1981).

Andere Studien geben 18% bei der Sinusitis und 23,5% Isolationshäufigkeit bei Kindern mit persistierendem Husten an (Brorson and Malmvall 1981; Tinkelman and Silk 1989).

Erkrankungen des unteren Respirationstraktes oder invasive Erkrankungen sind bei Kindern seltener, treten aber auch ohne prädisponierende Faktoren auf, vor allem bei Kindern unter einem Jahr (Wright, Wallace et al. 1990; Faden, Duffy et al. 1997).

Bei Erwachsenen sind es gerade solche vorbestehenden kardiopulmonalen Veränderungen oder Erkrankungen, auf deren Boden sich durch *M. catarrhalis* hervorgerufene Infektionen abspielen (McGregor, Chang et al. 1998). Dazu gehören chronische Bronchitiden bei Rauchern oder die COPD und andere chronische Lungenerkrankungen (Wright, Wallace et al. 1990; Murphy and Sethi 1992), virale Vorschäden (Arola, Ruuskanen et al. 1990) oder eine unspezifische Immunsuppression (McNeely, Kitchens et al. 1976; Diamond and Lorber 1984), die zu purulenten Exazerbationen vor allem im Bereich des unteren Respirationstraktes führen. *M. catarrhalis* wird hier in 13,5% der Fälle ebenfalls auch in Kombination mit *S. pneumoniae* und *H. influenzae* isoliert, wie z.B. das Alexander Projekt zeigt (Felmingham and Gruneberg 1996).

Die führende Position hält es bei der akuten Laryngitis des Erwachsenen, für die es sich in über 50% der Fälle verantwortlich zeichnet (Schalen, Christensen et al. 1980).

Der Großteil der respiratorischen Isolate kommt von älteren Patienten. In einer Studie von Wright et al. in Texas waren 81% von 42 Patienten mit einer *M. catarrhalis*-Pneumonie auf dem Boden einer zugrunde liegenden Vorerkrankung über 55 Jahre (Wright, Wallace et al. 1990), und obwohl die Pneumonie als mild beschrieben wird, starben 45% der Betroffenen innerhalb von drei Monaten, was für die ernste Prognose der Erkrankung spricht.

Das Phänomen eines nosokomialen Ausbruchs von *M. catarrhalis*-Infektionen gilt als gesichert (Enright and McKenzie 1997; McGregor, Chang et al. 1998; Karalus and Campagnari 2000), auch wenn der Ausbreitungsmodus noch nicht vollständig geklärt ist. Mehrere Wege wären denkbar und sind auch beschrieben worden: Kontamination der Pflege-Stationen tritt ebenso auf wie Kolonisation des Personals mit einer möglichen Verbreitung über die Hände (McGregor, Chang et al. 1998). Hinzu kommt die Fähigkeit des Keims in Sputum drei Wochen zu überleben (Ahmad, McLeod et al. 1985). Die Aquisition von *M. catarrhalis* ist mit der Länge des stationären Aufenthaltes assoziiert (Ikram, Nixon et al. 1993). Die auftretenden Infektionen waren zumeist auf den Respirationstrakt beschränkt oder traten ausschließlich auf pneumologischen Stationen auf (Karus and Campagnari 2000).

Manifestationen von *M. catarrhalis* außerhalb des Respirationstraktes sind beschrieben worden und führen gelegentlich zu ernsten Infektionen, sind aber im Allgemeinen selten. Fallberichte existieren von septischer Arthritis, Weichteilentzündungen, Osteomyelitis, Endo- und Perikarditis sowie neonataler Meningitis. Fälle von Bakteriämie sind ebenfalls selten, allerdings häufig mit  $\beta$ -Laktamase-Produzenten assoziiert (Karus and Campagnari 2000).

Die Möglichkeit der Kolonisation ohne Krankheitserscheinungen, für die der Keim so lange Zeit bekannt war, besteht nach wie vor. Hauptlokalisationsort ist der Respirationstrakt des Menschen, seltener traten Isolate der Konjunktiva und des Genitaltraktes auf (Blackwell, Young et al. 1978; Wilhelmus, Peacock et al. 1980). Umgekehrt gilt auch der Mensch als einziges Erregerreservoir (Henriksen 1976). Die Rate der Kolonisation ist von vielen Faktoren abhängig, wozu vor allen Dingen das Alter, aber auch Gesundheitszustand, sozioökonomischer Status, geographische Lokalisation und die Jahreszeit mit einer Häufung im Winter und Herbst gehören.

Größte Kolonisationsraten findet man bei Kindern, wobei die Zahlen einer großen Schwankungsbreite (28-100% im ersten Lebensjahr) unterliegen, für die obige Faktoren verantwortlich gemacht werden (Karalus and Campagnari 2000). Faden et al. konnten zeigen, dass Kinder zu 66% im ersten Lebensjahr und zu 77,5% im zweiten Lebensjahr kolonisiert werden und dass dabei drei bis vier unterschiedliche Stämme aufgenommen und determiniert werden (Faden, Harabuchi et al. 1994). Bei älteren Kindern von 3-12 Jahren finden sich noch Raten von 48,9% (Ejlertsen, Thisted et al. 1994), die auf Raten von 1-5% bei gesunden Erwachsenen abfallen (Karalus and Campagnari 2000), dann im Alter >60 Jahren jedoch auf 26,5% ansteigen (Vanechoutte, Verschraegen et al. 1990) und auch wieder höhere Werte bei Erwachsenen mit vorbestehenden Lungenerkrankungen zeigen (Karalus and Campagnari 2000).

Bei Erwachsenen entspricht Kolonisation ebenfalls einem dynamischen Prozess von Aufnahme und Elimination, bei dem ein Stamm im Durchschnitt 2,3 Monate nachweisbar bleibt (Klingman, Pye et al. 1995).

Offensichtlich kommt es innerhalb dieser Auseinandersetzung des Wirts mit dem Keim immer wieder zu Ausbrüchen einer Infektion: bei der kindlichen Otitis media konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* leicht vom Nasopharynx aus das Mittelohr erreichen kann und isolierte Stämme häufig identische Restriktionsendonuklease-Analysen zeigen (Dickinson, Loos et al. 1988), ferner sind Kolonisationsraten und Infektionsraten miteinander korreliert (Faden, Duffy et al. 1997) und die Abnahme der Kolonisation bei heranwachsenden Kindern geht mit einer Zunahme an IgG gegen *M. catarrhalis* einher (Ejlertsen, Thisted et al. 1994). Weitere Punkte legen nahe, dass Kolonisation die Basis für eine Infektion darstellen kann: Beide Phänomene zeigen eine ähnliche Altersverteilung mit niedrigen Kolonisations- und Infektionsraten bei Erwachsenen und höheren bei Kindern sowie eine ähnliche jahreszeitliche Verteilung mit deutlich höheren Werten während der Herbst- und Wintermonate (Enright and McKenzie 1997; McGregor, Chang et al. 1998; Karalus and Campagnari 2000).

An dieser Stelle rückt also das Wechselspiel von Virulenzfaktoren des Keims und der lokalen oder systemischen Antwort des Wirtes in den Mittelpunkt des Interesses. Untersuchungen auf diesen Gebieten zielen auf die Klärung der Genese von

Kolonisation und Infektion und deren Zusammenhänge ab, um dem Keim in wirkungsvoller Weise begegnen zu können.

Der Weg von *M. catarrhalis* im Bewusstsein der Wissenschaft zu einem etablierten humanen Pathogen, wurde begleitet von der zunehmenden Expression einer neuen Familie von  $\beta$ -Laktamasen, was nicht nur das pathogene Potential des Organismus unterstreicht, sondern auch zu einem Phänomen führt, welches als indirekte Pathogenität von *M. catarrhalis* bekannt ist: Die  $\beta$ -Laktamase von *M. catarrhalis* bietet nicht nur einen Schutz für die Bakterien, die das Enzym produzieren, sondern kann darüber hinaus die antibiotische Behandlung von Infektionen durch gefährlichere Krankheitserreger wie *S. pneumoniae* und/oder *H. influenzae* erschweren (Wardle 1986; Hol, Van Dijke et al. 1994). Dies lässt auch die Isolation von Mischkulturen von Atemwegspathogenen mit *M. catarrhalis* in einem neuen Licht erscheinen (Verduin, Hol et al. 2002).

Mittels isoelektrischer Fokussierung konnten Anfang der 80er Jahre zwei unterschiedliche Enzyme differenziert werden, die nach den Belgischen Stämmen aus denen sie zuerst isoliert wurden, zunächst *Ravasio* und *1908* genannt wurden (Farmer and Reading 1982). Später wird der *Ravasio*-Typ als BRO-1 und der *1908*-Typ als BRO-2 klassifiziert (Wallace, Steingrube et al. 1989). Die Bezeichnung BRO geht auf die Kombination aus *Branhamella* und *Moraxella* zurück (Wallace, Nash et al. 1990).

Der erste  $\beta$ -Laktamase-positive Stamm wurde 1977 isoliert. In diesem Jahr traten resistente Isolate in Schweden, Belgien, Großbritannien und Frankreich auf (Hoi-Dang, Brive-Le Bouguenec et al. 1978). Studien bezüglich antimikrobieller Sensibilität beschrieben alle Stämme vor 1970 als Penicillin-sensibel (Catlin 1970). Retrospektive Untersuchungen an konservierten Isolaten in Frankreich und den USA zeigten, dass alle bis 1976 isolierten Stämme keine  $\beta$ -Laktamase produzierten. Darunter fand sich ein bereits im Jahre 1976 isolierter Stamm aus den USA mit  $\beta$ -Laktamase-Aktivität (Philippon, Riou et al. 1986; Wallace, Steingrube et al. 1989). Das Auftreten von BRO- $\beta$ -Laktamasen war daher ein Ereignis, das plötzlich und praktisch simultan in der ganzen Welt auftrat (McGregor, Chang et al. 1998).

Der Anteil der  $\beta$ -Laktamase-Produzenten nahm kontinuierlich zu: Waren nach nur vier Jahren 1980 schon etwa 75% aller *M. catarrhalis*-Isolate in den USA und etwa

50% in Europa  $\beta$ -Laktamase-positiv, so stieg der Anteil 1990 in beiden Erdteilen auf über 80%. Heute sind über 90% aller Isolate aus Europa, den USA und Australien  $\beta$ -Laktamase-positiv. Diese Entwicklung entspricht dem schnellsten je beobachtetem Anstieg in der Prävalenz einer  $\beta$ -Laktamase bei einer Spezies (Enright and McKenzie 1997; Verduin, Hol et al. 2002).

Die beispiellose Ausbreitung der BRO- $\beta$ -Laktamasen deutet auf einen wirkungsvollen horizontalen Transfermechanismus hin. Dafür spricht auch die genetische Heterogenität, die bei *M. catarrhalis*-Stämmen beobachtet wird (McGregor, Chang et al. 1998).

Weitaus die Mehrheit aller  $\beta$ -Laktamase-positiven Stränge produziert BRO-1: man geht von einem Anteil von 90-95% aus, weniger als 10% produzieren BRO-2. Das Verhältnis scheint in den letzten zehn Jahren konstant gewesen zu sein und zeigt auch im geographischen Vergleich keine signifikanten Abweichungen (Philippon, Riou et al. 1986; Fung, Yeo et al. 1994; Ejlersen and Skov 1996; McGregor, Chang et al. 1998). Die simultane Produktion von BRO-1 und BRO-2 ist bisher bei keinem einzigen Stamm beobachtet worden (Ejlersen and Skov 1996; McGregor, Chang et al. 1998).

BRO-1 und BRO-2 unterscheiden sich von den  $\beta$ -Laktamasen anderer gram-negativer Bakterien durch ihr Pattern in der IEF und ihr Substratprofil. Sie werden nur noch bei zwei nahen Verwandten, *M. lacunata* und *M. nonliquefaciens*, gefunden (McGregor, Chang et al. 1998).

Nicht alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika werden durch die Enzyme inaktiviert. Während die BRO- $\beta$ -Laktamase-Produzenten Penicillin, Amoxicillin und Ampicillin schnell hydrolysieren, wird die Aktivität von Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporinen bisher praktisch nicht beeinträchtigt (Farmer and Reading 1982; Kallings, Bengtsson et al. 1983; Wallace, Steingrube et al. 1989; Fung, Yeo et al. 1994). Beide Enzyme werden durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure leicht inaktiviert. (McGregor, Chang et al. 1998). In ihrem Substrat- und Hemmungsprofil sind BRO-1 und BRO-2 identisch, was den Blick auf Aminosäure- und codierende Sequenz lenkt.

Die Enzyme sind chromosomal codiert und das *bro*-Gen von 945 bp verschlüsselt für ein Polypeptid von 314 Aminosäuren. *bro1* und *bro2* unterscheiden sich lediglich durch fünf unterschiedliche Basen, von denen nur eine in einem Aminosäureaustausch resultiert. BRO-2 enthält Gly anstatt Asp an Position 294, was

das unterschiedliche Verhalten in der IEF erklären kann (Bootsma, van Dijk et al. 1996; Bootsma, Aerts et al. 1999; Bootsma, van der Heide et al. 2000; Bootsma, van Dijk et al. 2000).

Die Beobachtung, dass BRO-1 mit höheren MHK-Werten als BRO-2 assoziiert ist, wird auf die Produktion einer etwa dreifach größeren Menge an Enzym aufgrund unterschiedlicher transkriptionaler Aktivität der Gene zurückgeführt. Bootsma et al. beschrieben eine Deletion von 21 bp in der Promotorregion eines BRO-2 produzierenden Stammes, die neben weiteren Abweichungen den größten Unterschied zwischen beiden Genen ausmachte und auch die potenzielle -10- und -35-Sequenz berührte. Die Gene werden demnach offensichtlich durch unterschiedliche Promotoren kontrolliert. Hierin wird der entscheidende Beitrag für die geringere  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der BRO-2-Produzenten gesehen (Wallace, Steingrube et al. 1989; Wallace, Nash et al. 1990; Bootsma, van Dijk et al. 1996).

Darüber hinaus vermuteten Richter et al. (Richter, Winokur et al. 2000), dass zusätzliche unbekannte Mutationen oder Deletionen/Insertionen in der regulatorischen Region des Gens die Variationen in den MHK-Werten der BRO-1 und BRO-2 produzierenden *M. catarrhalis*-Isolate, die in einigen Surveillance-Studien beobachtet wurden, erklären können.

Vor diesem Hintergrund erregt die Promotorregion der BRO- $\beta$ -Laktamasen ein besonderes Interesse, dem in dieser Arbeit nachgegangen werden soll.

Auf die Bedeutung von Virulenzfaktoren wurde bereits eingegangen. Ein wichtiger Virulenzfaktor ist sicherlich die Fähigkeit einiger *M. catarrhalis*-Stämmen der Lyse durch Komplement in menschlichem Blutserum zu widerstehen, da Komplement eine tragende Rolle in der Wirtsabwehr gegen gram-negative Bakterien spielt. So konnte für *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* gezeigt werden, dass Patienten mit einem Mangel an Komplement 8000fach gefährdeter für eine Infektion durch diese Organismen waren (Enright and McKenzie 1997).

Die klinische Relevanz von Komplement-Resistenz zeigt sich in einer Untersuchung an 40 Isolaten aus dem Sputum älterer Patienten (Murphy, Fitzgerald et al. 1997): Von jeweils 20 Isolaten waren 13 in der Gruppe der kranken Patienten aber nur zwei in der gesunden Kontrollgruppe gegen Komplement vermittelte Lyse resistent. Zu ähnlichen Zahlen kommt eine Studie von Hol et al. (Hol, Verduin et al. 1995), die 62% Komplement-resistente und 27% intermediär-sensible Isolate bei älteren

Patienten mit bronchopulmonaler Infektion finden. Die Studie untersuchte ebenfalls das Sputum gesunder Kinder im Alter von 4-13 Jahren mit 33% resistenten und 8,5% intermediär-sensiblen Isolaten. Erkrankte Kinder wurden nicht untersucht. Beide Veröffentlichungen sehen eine enge Assoziation zwischen Erkrankung und Komplement-Resistenz.

Der Mechanismus der resistente Stämme der Lyse durch Komplement widerstehen lässt ist nicht vollständig aufgeklärt. Für verschiedene Oberflächenstrukturen von *M. catarrhalis* wie LOS (Zaleski, Scheffler et al. 2000), HMW-OMP, auch bekannt als UspA, in Bindung von humanem Vitronektin (Verduin, Jansze et al. 1994) oder auch für OMP CopB/OMP B2 (Helminen, Maciver et al. 1993) ist gezeigt worden, dass sie eine entscheidende Rolle für die Resistenz gegenüber Lyse durch Humanserum spielen können. Die Heterogenität der bisherigen Ergebnisse lässt Verduin et al. (Verduin, Hol et al. 2002) auf einen hoch multifaktoriellen Prozess als Interaktion von Keim und Wirt für die Ausbildung der Komplement-Resistenz schließen.

Umso erstaunlicher erscheint dann vielleicht die These, dass Komplement-resistente *M. catarrhalis*-Stämme eine Subpopulation eigenständiger genetischer Herkunft innerhalb der Spezies bilden, was kürzlich von einigen Autoren aufgrund verschiedener molekulargenetischer Untersuchungen postuliert wurde (Bootsma, van der Heide et al. 2000; Verduin, Kools-Sijmons et al. 2000; Wolf, Kools-Sijmons et al. 2000).

Unter der Voraussetzung, dass Komplement-resistente *M. catarrhalis*-Stämme eine eigenständige genetische Subpopulation bilden, sollte eine niedrige oder fehlende Korrelation zwischen den Eigenschaften der Komplement-Resistenz und der  $\beta$ -Laktamase-Produktion auf den Verbreitungs-Modus eines horizontalen Transfers der Gene schließen lassen und die derzeitigen Annahmen stützen.

## 1.1 Fragestellung

Das erste Ziel der Studie war die Art der vorkommenden  $\beta$ -Laktamasen und mögliche Modifikationen der regulatorischen Region in europäischen *M. catarrhalis*-Isolaten zu charakterisieren. Die prozentuale Prävalenz der zwei Enzymtypen wurde ebenfalls bestimmt und die Korrelation zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) für 29 Antibiotika ermittelt.

Das zweite Ziel bestand in der Erfassung des Anteils der Komplement-resistenten Isolate, um die Verbindung zwischen Komplement-Resistenz und der  $\beta$ -Laktamase-Produktion zu analysieren. Ihre Korrelation war von Interesse, um Aussagen über den Verbreitungsmodus der BRO- $\beta$ -Laktamasen zu treffen.

In einem ersten Schritt wurden 419 *M. catarrhalis*-Isolate der europäischen SENTRY-Studie in einem Disk Assay auf  $\beta$ -Laktamase-Aktivität überprüft. Anschließend wurden alle Isolate zur Differenzierung zwischen BRO-1- und BRO-2-Produktion einem PCR-Screening unterzogen. Der prozentuale Anteil  $\beta$ -Laktamase-negativer Isolate, der BRO-1- und BRO-2-Produzenten, sowie die Sequenz der Promotorregionen vorkommender *bro*-Gene konnten so bestimmt werden.

Die MHK für jeden Stamm und jedes der 29 Antibiotika wurde bestimmt.

Die Verteilung der MHK der getesteten Antibiotika für jede der drei Gruppen wurde ermittelt und einander gegenübergestellt.

In einem letzten Schritt erfolgte die Testung auf Komplement-Resistenz und Bestimmung des Anteils der Komplement-resistenten Isolate innerhalb der jeweiligen Gruppen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterien

Untersucht wurden insgesamt 419 *M. catarrhalis*-Stämme. Sie entstammen 24 unterschiedlichen Universitätskliniken in 13 Ländern Europas und wurden von April 1997 bis Dezember 1999 im Rahmen des European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programm isoliert. Es wurden die Isolate aus respiratorischen Sekreten von Patienten mit ambulant erworbenen Infektionen des Respirationstraktes oder nosokomialer Pneumonie ausgewählt. Dabei wurde nur ein Isolat pro Patient verwendet. Die Identifizierung der Keime erfolgte im Rahmen der SENTRY-Studie durch konventionelle Kriterien (Knapp and Rice 1995). Zum Ausschluss von Verunreinigungen erfolgte vor jeder Verarbeitung eine makroskopische Beurteilung der Kolonien. Die Archivierung der Isolate erfolgte auf Mikrobank, was eine kontaminationsfreie und zuverlässige Konservierung bei unproblematischem Zugriff erlaubte. Die Bebrütung der Kulturen geschah in einem Brutraum bei 37°C, die kurzfristige Lagerung in einem Kühlraum bei 4°C.

### 2.2 Chemikalien

#### 2.2.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen

10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung = APS (Ambresco)

1,0 g Ammoniumpersulfat

10,0 ml H<sub>2</sub>O

Dextranblau / EDTA: 25mM EDTA pH 8,0; 50 mg/ml DB

Formamid (Verhältnis Formamid: DB/EDTA 5:1) (Amresco)

Acrylamidgel (29:1): 40%ige Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (29:1) in Aqua bidest. (29 g Acrylamid, 1g Bisacrylamid) (Sigma)

10 x conc.TBE-Puffer (für 1l)

108,0 g 890 mM Tris Base

55,0 g 890 mM Borsäure

7,4 g 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA

TEMED = N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (Ambresco)

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) (BioRad)

Bluemarker (6 x conc. Gel-Ladungspuffer) (Gibco BGL)

Bromphenolblau (0,25% w/v) = BPB

Xylenecyanole FF (0,25% w/v)

Sucrose (40% w/v)

Mit Glycerin im Verhältnis 1:1 verdünnt

1 Kb DNA Molekulargewichtsmarker (10 µl Aliquots mit 1 µg Marker) (Gibco BGL)

1,0 µl Marker

7,5 µl Aqua bidest.

1,5 µl 6xBPB

10 mM Tris-Cl (pH 8,5) (Merck)

Mikrobank mit Kryolösung und porösen Keramik-Mikrosphären (Pro-Lab)

PBS, Phosphate (10 mM)-buffered saline (pH 7,3)

PBS-BSA, PBS mit 5% bovinem Serumalbumin

VBS<sup>2+</sup>, Veronal (5 mM)-buffered saline (pH 7,4) mit 0,15 mM Ca<sup>2+</sup> und 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>

HPS, humanes gepooltes Serum von 30 gesunden Freiwilligen

## 2.2.2 Antibiotika

Sämtliche Antibiotika lagen als Pulver vor und wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst und verwendet.

Penicillin

Amoxicillin

Amoxicillin/Clavulansäure

Cefaclor

Loracarbef

Cefuroxim

Cefprozil

Cefpodoxim

Cefixim

Ceftibuten

Cefotaxim

Ceftazidim

Cefepim

Faropenem

Ciprofloxacin

Levofloxacin

Sparfloxacin

Gatifloxacin

Trovafloxacin

Grepafloxacin

Moxifloxacin

Gemifloxacin

Erythromycin

Azithromycin

Clarithromycin

Telithromycin

Tetracyclin

Rifampicin

Sulfamethoxazol/Trimethoprim

### 2.2.3 Testblättchen

Nitrocefin (50 µg pro Testblättchen)

(Cefinase disks, BBL Microbiology Systems Cockeysville, MD, USA)

### 2.2.4 Kits

Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) bestehend aus:

Enzyme mix, high fidelity (Taq-Polymerase)

Expand HF buffer, 10 x conc. without MgCl<sub>2</sub>

MgCl<sub>2</sub> stock solution: 25 mM MgCl<sub>2</sub>

PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim)

Quiaquick PCR-Purification-Kit (250) (Qiagen)

ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Premix) (Perkin Elmer)

## 2.3 Primer (Gibco BGL)

Für die Sequenzierung der Promotorregion der *bro*-Gene benutzten wir die von Bootsma et al. (Bootsma, van Dijk et al. 1996) verwendeten Sequenzen. Diese waren für *bro1* und *bro2* identisch.

Primer (GIBCO BRL Custom Primers, Life Technologies):

forward: 5'-CCTGTGGGACAAGCRAACGG-3'

reverse: 5'-GTAAAAAATGACGGCGTTGC-3'

## 2.4 Nährmedien

### Müller-Hinton-Bouillon (Oxoid)

Getrocknete Infusion aus 300g Rindfleisch	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l

### Müller-Hinton-Agar, pH 7,4 (mit und ohne Schafsblut) (Oxoid)

Getrocknete Infusion aus 300 g Rindfleisch	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l
ggf. Schafserythrozyten	

### BHI-Agar (37 g/l) (Difco)

Nährstoffkonzentrat aus 200 g Kalbshirn	
Nährstoffkonzentrat aus 250 g Rinderherz	
Proteosepepton	10,0 g
D-Glukose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	2,5 g

## 2.5 Apparaturen

Dr. Lange-Photometer (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin)

RoboCycler<sup>®</sup> Gradient 96 Temperature Cycler with Hot Top Assembly (Stratagene)

DNA-Sequenzer 377 (ABI Prism)

## **2.6 Untersuchungsmethoden**

### **2.6.1 Bakterienkonservierung**

Die Bakterien wurden zur Konservierung auf Mikrobank überführt. Bei diesem System befindet sich in einem sterilen Plastikröhrchen mit Schraubverschluss etwa 1 ml flüssiges Kryomedium und 25 Plastikkügelchen (Durchmesser etwa 1,5 mm), deren Oberfläche durch Säurebehandlung porös ist. Eine Kolonie wird mit der gut ausgebrannten Öse in das Kryomedium gegeben. Nach Verschließen wird das Röhrchen 4 bis 5 Mal sachte hin- und hergeschwenkt. Dabei erfolgt eine feste Anlagerung der Zellen an die Oberfläche der Mikrosphären. Anschließend wird das Kryomedium mit einer sterilen Pipette abgesaugt und wieder verschlossen. Die Mikrobank wird bei -20 bis -70 °C tiefgekühlt aufbewahrt. Zur Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium und Ausstreichen auf Agarplatten genügt ein Plastikkügelchen.

### **2.6.2 Sterilisation**

Je nach zu sterilisierendem Material kamen drei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Die Dampfdrucksterilisation von Eppendorfcups, Pippettenspitzen, Nährmedien und destilliertem Wasser erfolgte im Autoklaven bei 121°C und 1,2 hPa für 20 Minuten. Ebenso behandelt wurden infektiöse Abfälle wie benutzte Pipettenspitzen, bewachsene Agarplatten und Nährmedien etc. Glasgeräte wurden nach dem Spülen mittels Hitzesterilisation bei 160° für 8 Stunden in einem Trockenschrank keimfrei gemacht. Für hitzelabile Materialien wie Antibiotika kam die Sterilfiltration zur Anwendung.

### **2.6.3 Messung der optischen Dichte**

Die Ermittlung der Zellkonzentration einer Bakterienkultur erfolgte über die Messung der Lichtabsorption einer Probe mittels eines Photometers nach dem Lambert-Beertschen-Gesetz, nach dem die Extinktion des Lichtes durch eine Suspension im Vergleich zu einem Leerwert bei konstanter Partikelgröße proportional der durchstrahlten Schichtdicke und Partikelkonzentration ist.

Zur Messung wurde ein Quantum der zu untersuchenden Bakterienkultur in eine Quarzküvette gegeben. Die durchstrahlte Schichtdicke entsprechend den Innenmaßen der Küvette betrug 1cm. Als Leerwert diente die gereinigte, mit sterilem Wasser gefüllte Küvette. Je nach gemessenem Wert konnte die Bakterienkultur zur weiteren Verarbeitung auf das nötige Maß verdünnt werden.

### **2.6.4 Bestimmung der MHK**

Die minimale Hemmkonzentration gibt die niedrigste Antibiotikakonzentration an, ab der kein Bakterienwachstum mehr stattfindet. Sie ist damit ein für jeden Stamm und jedes Antibiotikum zu ermittelnder Wert.

Ihre Bestimmung erfolgte mit dem Mikrotiterverfahren. Dazu kommen Mikrotiterplatten zum Einsatz, welche 12 x 8 Vertiefungen aufweisen, in die jeweils Doppeltansätze pipettiert werden.

Eine Übernachtskultur des zu bestimmenden Stammes wird entweder von einer bebrüteten Agarplatte oder direkt von einer Mikro-Bank angesetzt und deren optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessen. Zur Standardisierung der Zelldichte wird die Kultur auf 0,1 optische Dichte verdünnt. 9,9 ml doppelt konzentrierter Müller-Hinton-Brühe werden mit 100 µl der Bakteriensuspension beimpft. Die verwendete Antibiotikallösung muss aufgrund des Verfahrens vierfach höher konzentriert sein als die höchste zu testende Stufe. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wird mit Hilfe der Multipette 100 µl H<sub>2</sub>O vorgelegt. In das oberste Loch jeder Reihe wird ebenfalls 100 µl Antibiotikallösung gegeben und durchgemischt, was eine erste Verdünnung der Antibiotikakonzentration um den Faktor zwei bedingt. 100 µl dieser Mischung werden jetzt in das zweite Loch jeder Reihe gegeben und ebenfalls vermischt. Die jeweils zweiten Vertiefungen besitzen

damit nur noch die Hälfte der Konzentration. Es wird in dieser Weise bis zur niedrigsten Stufe fortgefahren. Dabei bleibt die unterste Vertiefung jeder Reihe als Leerwert zur Kontrolle, ob überhaupt ein Wachstum stattfindet, ohne Antibiotikum. Alle Löcher einer Platte enthalten jetzt 100 µl Lösung in einer um Zweierpotenzen abfallenden Antibiotikakonzentration. Nun erfolgt die Beimpfung aller Löcher mit 100 µl der vorbereiteten Bakteriensuspension, wobei eine zweite Verdünnung der Antibiotikakonzentration um den Faktor zwei stattfindet. Als Qualitätskontrolle dient neben den schon erwähnten Leerwerten für jedes Antibiotikum und jeden Stamm ein mitgeführter Referenzstamm pro Antibiotikum mit bekannter MHK. Die Mikrotiterplatten werden für 24 h bei 37°C inkubiert.

Die Auswertung erfolgte mit einem Spezialphotometer bei 620 nm. Bei bewachsenen Vertiefungen ist ein deutliches Pellet zu erkennen, das den Lichtstrahl schwächt. Die Vertiefung mit der niedrigsten Antibiotikakonzentration, die kein Wachstum und damit keine Lichtschwächung zeigt, sollte für beide Reihen des Doppeltansatzes gleich sein und gilt als minimale Hemmkonzentration.

### **2.6.5 Agardiffusionstest**

Eine Kolonie des zu untersuchenden Bakterienstammes wird in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und 0,5 ml dieser Suspension auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen wird das entsprechende Testplättchen auf den Agar gelegt. Das Testplättchen besteht aus Filterpapier, das mit dem zu testenden Antibiotikum getränkt ist. Die so präparierten Kulturen werden für 24 h bei 37°C bebrütet. Das Antibiotikum diffundiert in den umliegenden Agar. Abhängig von der Resistenzlage des Bakterienstammes wird dessen Wachstum ab einer bestimmten Antibiotikakonzentration gehemmt. Entsprechend der konzentrischen Diffusion mit nach außen hin abnehmender Konzentration findet bei einem sensiblen Bakterienstamm in einem kreisförmigen Bereich um das Testplättchen kein Wachstum statt, resistente Stämme zeigen sich in ihrem Wachstum unbeeinflusst. Nach der Größe dieses Hemmhofes und der Grenzwertdichte aus der DIN-Vorschrift (nach DIN 58940) kann eine Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) erfolgen. Die Testung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität erfolgte durch einen kommerziell erhältlichen konventionellen chromogenetischen Cephalosporin Disk Assay, der

Nitrocefin als Substrat enthält (Cefinase disks, BBL Microbiology Systems Cockeysville, MD, USA).

### **2.6.6 Agarosegelelektrophorese**

Dieses Verfahren kam an drei Stellen der Sequenzierung zum Tragen. Nach der Polymerase-Kettenreaktion diente es zum Nachweis des PCR-Produkts und zur Überprüfung seiner Länge, die neben der mitgeführten Wasserprobe eine Kontrolle der Spezifität liefert. Nach der Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese eine semiquantitative Einschätzung der DNA-Menge. Im letzten Schritt war wieder die Fragmentlänge von entscheidender Bedeutung: Bei der Abtastung mit einem Argonlaser wurde der entsprechenden Base die jeweilige Lokalisation innerhalb des DNA-Stranges zugeordnet.

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt in einem elektrischen Gleichspannungsfeld. Dabei wandern die elektrisch negativ geladenen Partikel entlang den Feldlinien auf die positiv geladene Anode zu. Die Länge des Weges, den die Teilchen im Feld pro Zeiteinheit zurücklegen, wird außer durch die Höhe der Spannung durch die Wechselwirkung des DNA-Moleküls mit dem Trägermaterial bestimmt. Die Anziehungskräfte zwischen Trägermaterial und Partikel sind abhängig von deren chemischen Eigenschaften, die durch den umgebenden Puffer noch in wünschenswerterweise beeinflusst werden. Bei gleichem molekularem Aufbau der einzelnen DNA-Stränge ist die Fragmentlänge der entscheidende Parameter. Kürzere DNA-Fragmente legen aufgrund geringerer Anziehungskräfte einen größeren Weg zurück.

Detaillierte Beschreibungen der technischen Realisation finden sich in den entsprechenden Kapiteln.

## 2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion

Mit diesem hoch sensiblen Verfahren ist es möglich, die interessierenden Nukleinsäureabschnitte für die Untersuchung ihrer Sequenz zu vervielfältigen. Wie bei der DNA-Synthese in vivo dient ein DNA-Strang als Matrix, an dem der jeweilig komplementäre Strang durch fortlaufende Anlagerung des entsprechenden Nukleotids synthetisiert wird. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym Taq-Polymerase aus dem *Bacillus thermophilus aquatus*, das gegen Hitze stabil genug ist, um die erforderlichen Temperaturen des Verfahrens zu überstehen. Durch Wiederholung der einzelnen Schritte des Verfahrens wird ein exponentieller Zuwachs an spezifischer DNA erzielt, was vollautomatisch in einem Robocycler der Firma Stratagene geschah, der auf die einzuhaltenden Temperaturen und Haltezeiten programmiert war.

In einem Ansatz werden der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz in Form einer Bakterienkolonie, PCR-Puffer,  $MgCl_2$ , ein korrespondierendes Paar definierter Oligonukleotid-Sequenzen als spezifische Primer, eine Lösung mit den vier Desoxyribonukleinsäurephosphaten gewissermaßen als Bausteine sowie die Taq-Polymerase hinzugegeben und mit Wasser nach folgendem Schema aufgefüllt:

Einfachansatz: 50  $\mu$ l insgesamt

H <sub>2</sub> O (Aqua bidest):	33,4 $\mu$ l
PCR-Puffer, Expand HF buffer, 10 x conc. without $MgCl_2$ :	5 $\mu$ l
$MgCl_2$ stock solution: 25 mM $MgCl_2$ :	5 $\mu$ l
PCR Nukleotide Mix:	2 $\mu$ l
Primer:	2x2 $\mu$ l
DNA-Taq-Polymerase:	0,6 $\mu$ l

Für jede Probe werden Doppeltansätze in Micro-Cups pipettiert, ebenso eine Wasserprobe zur Qualitätssicherung, die alle Substanzen bis auf die Bakterien-DNA enthielt. Zeigt die Wasserprobe eine Bande, so muss von einer Verunreinigung mit ggf. unspezifischer Bindung ausgegangen werden.

Die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem *Bacillus thermophilus aquatus* überdauert den gesamten Ablauf des Verfahrens in ausreichender Aktivität und muss nicht neu

hinzugegeben werden. Sie verknüpft die einzelnen sich anlagernden Nukleotide zu einem kontinuierlichen Strang. Als Primer wurden die von Bootsma et al. (Bootsma, van Dijk et al. 1996) angegebenen Sequenzen verwendet. Diese Oligonukleotide flankieren den zu amplifizierenden Bereich auf den jeweils zueinander komplementären Strängen und markieren so je einen Startpunkt der Synthese durch die Taq-Polymerase. PCR-Puffer und  $MgCl_2$  stabilisieren die Lösung.

Die PCR beginnt mit dem Schritt der Denaturierung. Hierbei werden innerhalb von 2 min. bei  $93^\circ C$  die Membranen der Bakterienzelle, die als Ganzes zugegeben wird, aufgebrochen und die jetzt frei in Lösung befindliche DNA in ihre Einzelstränge getrennt. Anschließend erfolgt die Amplifizierung, die aus insgesamt 30 Zyklen mit den Phasen einer weiteren Denaturierung, dem Annealing (Primerbindungsphase) und der DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase besteht. Durch diese Reihenfolge der Programmierung wird die initiale Denaturierung um 30 s verlängert. Die Temperatur der Denaturierungsphase innerhalb der Zyklen der Amplifizierung beträgt ebenfalls  $93^\circ C$ . Das Annealing erfolgt bei  $55^\circ C$  für 1 min. Hierbei lagern sich die Primer spezifisch an ihre komplementäre Sequenz an. Die optimale Temperatur ist hier von der Basen-Zusammensetzung der Primer abhängig. Bei zu hoher Temperatur können sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen zur Bindung der Stränge nicht ausbilden, bei zu tiefer Temperatur erfolgt die Bindung zu unspezifisch, so dass keine Amplifizierung identischer Sequenzen geschehen kann. In der dritten und letzten Phase eines Zyklus erfolgt bei  $72^\circ C$  für 40 s die Synthese des komplementären Stranges. Außerhalb eines Bereichs um das Reaktionsoptimum von  $72^\circ C$ , dementsprechend während der Denaturierung und des Annealings, ist die Taq-Polymerase inaktiv. Die Dauer dieser Phase von 40 s erwies sich bei einer Länge des Produkts von 238 bp als ausreichend, gemäß der Formel 1 min/kb.

Im letzten Schritt der PCR findet eine letzte Polymerisation bei  $72^\circ C$  für 4 min statt. Noch unvollständige Sequenzen können sich während dieser Zeit an ihr Pendant anlagern und vervollständigt werden.

Das PCR-Programm entsprach den Angaben von Bootsma et al. (Bootsma, van Dijk et al. 1996):

PCR-Programm:

Denaturierung:		93°C	2min
Amplifizierung: 30 Zyklen	Denaturierung:	93°C	30 s
	Annealing:	55°C	1 min
	Polymerisation:	72°C	40 s
Polymerisation:		72°C	4 min

Zum Nachweis des PCR-Produkts und der Überprüfung auf Spezifität erfolgte eine Agarosegelelektrophorese und Auswertung unter UV-Licht.

Trägermaterial ist ein einige Millimeter starkes Gel aus 100 ml TBE-Puffer und 2 g Agarose. Die Mischung wird in einem Mikrowellengerät erhitzt und mit einem Zusatz von 10 µl Ethidiumbromid versehen, welches die DNA später unter UV-Licht fluoreszieren lässt. Die Gele werden auf einem etwa 25 x 12 cm großen Schlitten aus Plexiglas gegossen. Dabei ragen in das flüssige Gel am oberen Rand und mittig zwei Reiter herein, welche die je 20 Probenschlitze formen. Der Schlitten kann nach Erkalten des Gels und Entfernen der Reiter direkt in die mit Pufferlösung gefüllten Elektrophoresekammern überführt werden. Die Gele sollten während der Elektrophorese von der TBE-Pufferlösung vollständig bedeckt sein.

Bei einer Gleichspannung von 80 mV und 2%igen Gelen konnte bei Fragmentlängen von einigen hundert Basen mit Laufzeiten von 40-45 min gerechnet werden.

Nach erfolgter PCR werden jedem einzelnen Ansatz 8 µl entnommen, mit 4 µl Bluemarker in einem Eppendorf-Cup vermischt und zur besseren Pippetierbarkeit kurz abzentrifugiert. Die so vorbereiteten Proben können jetzt auf das Gel aufgetragen werden. Der Bluemarker beschwert die Proben und verhindert mit seinem Glycerinanteil die Vermischung mit dem TBE-Puffer der Elektrophoresekammer. Die Proben sinken als gut sichtbare blaue Phase auf den Boden der Probenschlitze. Die Wanderung des Bluemarkers, allerdings nicht mit gleicher Geschwindigkeit wie die DNA, zeigt auch den Fortschritt der Elektrophorese an. Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid lagert sich interkalierend der DNA an. Bei Betrachtung unter UV-Licht ergibt die so markierte und im Gleichspannungsfeld

gewanderte DNA eine sichtbare Bande. Nur die Wasserprobe ohne bakterielle DNA sollte keine Bande zeigen. Zur Kontrolle der Länge des Produkts wird ein synthetisch hergestellter Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Er enthält ein diskretes Spektrum DNA definierter unterschiedlicher Größe, das nach Auftrennung in der Elektrophorese als Bandenmuster gewissermaßen einen Maßstab erzeugt. Bei bekannter Länge des Produkts kann so im Vergleich der Laufweiten der Erfolg der PCR überprüft werden. Mit einer Fotokamera werden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht abfotografiert (s. Abb. 2)

### **2.6.8 Aufreinigung**

Zur Isolierung des PCR-Produktes von Überresten der Bakterien, zugegebenen Salzen, Primern und Taq-Polymerase erfolgte im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion das Verfahren der Aufreinigung mittels einer Ionenaustauschersäule.

Dazu werden die beiden Proben eines jeden Doppeltansatzes mit je 300 µl des PB-Puffers vermischt und zusammen in eine Aufreinigungssäule (Qiaquick spin column) gegeben. Das Vermischen und Abpipettieren erfordert etwas Fingerspitzengefühl, da die Mikro-Cups nur etwas mehr als 100 µl Fassungsvermögen besitzen. Die Säule steht in einem 2 ml großen Sammelgefäß (Collection tube), das die eluierten Lösungen bei den Zentrifugationen auffängt. Bei der ersten Zentrifugation mit 13.000 rpm während einer Minute werden alle Bestandteile, die sich nicht wie die DNA des PCR-Produktes an die Membran der Säule binden abzentrifugiert und anschließend verworfen. Es werden danach 700 µl PE-Puffer (Waschpuffer) in die Säule pipettiert und wieder für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dabei werden unspezifische Substanzen mit Bindung an die Membran ausgewaschen, die spezifische DNA des PCR-Produkts bleibt weiterhin in der Säule. Ein weiteres Zentrifugieren gewährleistet die vollständige Entfernung des Waschpuffers, der samt dem Sammelgefäß verworfen wird. Die DNA wird bei einer letzten Zentrifugation mittels 50 µl 10 mM Tris-NaCl (pH 8,5) in beschriftete Eppendorf-Cups eluiert. Die Eppendorf-Cups dienen zur Aufbewahrung der gereinigten DNA im Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung.

Zur Kontrolle des Erfolgs der Aufreinigung und zur semiquantitativen Beurteilung der Menge des erhaltenen Produkts, die für die folgende Sequenzierreaktion maßgeblich ist, erfolgte eine weitere Agarosegelelektrophorese.

Es kommen die gleichen Gele wie oben beschrieben zur Anwendung. Allerdings werden jetzt nur 4 µl der Proben mit 4 µl Bluemarker gemischt und auf ein 2%iges Gel aufgetragen. Durch Verdünnen des Molekulargewichtsmarkers mit Bluemarker im Verhältnis 1:1 und 3:5 erhält man drei Marker mit unterschiedlichem DNA-Gehalt. Einheitlich 5 µl werden in drei benachbarte Probenschlitze pipettiert, so dass sich bei der Kontrolle unter UV-Licht auch drei entsprechende Intensitäten ergeben. Die Helligkeit der 1,6 kb Bande der Marker dient als Vergleichskriterium. Je nach Konzentration enthält sie 50, 25 oder 15 ng an DNA. Der Gehalt an spezifischer DNA jeder Probe wird durch Vergleich in 5 Kategorien eingeteilt, je nachdem, ob die Bande in ihrer Helligkeit etwa gleich ist oder genau zwischen den Abstufungen der Marker liegt. Eine wiederholte Kontrolle der Länge des DNA-Produkts ist auch an dieser Stelle durch Vergleich der Laufweite mit den Banden der Marker möglich. (s. Abb. 3)

### **2.6.9 Sequenzierreaktion**

Die in der PCR vervielfältigte und im vorigen Arbeitsgang aufgereinigte spezifische DNA wurde in diesem Schritt so aufgearbeitet, dass vom 5'-Ende beginnend sämtliche Fragmentlängen synthetisiert und am Abbruchende fluoreszenzmarkiert wurden, so dass die Detektion mit dem Argonlaser in der Sequenzierung möglich wurde. Das Verfahren entsprach der von der Fa. Applied Biosystems Inc. (ABI PRISM) 1990 eingeführten Taq-Cycle-Sequencing-Methode.

Analog der Polymerase-Kettenreaktion werden in aufeinander folgenden Zyklen mit den Phasen Denaturierung, Annealing und Polymerisation zum Matrix-Strang komplementäre Stränge synthetisiert. Werden zu einem zufälligen Zeitpunkt statt der herkömmlichen Nukleotidmonophosphate die zugegebenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (Dye Terminatoren) eingebaut, so kommt es mangels Verknüpfungsmöglichkeit unmittelbar dahinter zum Kettenabbruch (modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger). Da nur der 5'-Primer eingesetzt wird, entsprechen alle gebildeten Stränge der forward Richtung. Dementsprechend

stammen alle dazu komplementären Stränge aus der PCR, liegen so gut wie ausschließlich in voller Länge vor, sind nicht fluoreszenzmarkiert und interferieren daher auch nicht mit der Sequenzierung.

Die Synthese erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll:

	96°C	10 sec
(25 Zyklen)	50°C	5 sec
	60°C	4 min

In jeden Einfachansatz werden je nach Zuordnung zu den fünf Kategorien des Helligkeitsvergleichs 6,8,10,12 oder 15 µl spezifisches DNA-Template pipettiert. Dazu kommen bei 6 und 8 µl Template 3 µl bzw. bei 10, 12 und 15 µl Template 4 µl Premix-Lösung, die stabilisierende Salze, Nukleotide und die Taq-Polymerase enthält. Von der Lösung des 5'-Primers wird pro Ansatz 1 µl hinzugegeben. Abschließend wird mit Aqua dest. auf 15 bzw. 20 µl Gesamt-Volumen aufgefüllt.

### 2.6.10 Fällung

Die für die Sequenzierung mit den beschriebenen Verfahren vorbereitete DNA wurde in diesem Schritt gefällt.

Die Proben aus der Sequenzierreaktion werden mit H<sub>2</sub>O ad 100 µl versetzt und anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Cups mit 250 µl 96%igem Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung mit pH 4,6 überführt. Nach einem kurzen Durchmischen auf dem Vortex werden die Proben bei 13.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, wobei die DNA auf dem Boden des Gefäßes präzipitiert. Der Überstand wird verworfen. Es folgt ein Waschen in 300 µl 70%igem Ethanol und einer erneuten Zentrifugation mit 13.000 rpm für 15 min., auch hier wird der Überstand verworfen. Reste des Ethanols werden durch Trocknen der Pellets im Eppendorf-Cup an Luft oder schneller im Speed-Vac entfernt. Die gefällte DNA ist auch bei Raumtemperatur sehr stabil, und die Proben waren daher gut konservierbar.

### 2.6.11 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wurde die in der Sequenzierreaktion erzeugte Markierung der unterschiedlich langen Fragmente ausgenutzt: Die Laufweite des Fragments ließ auf die Position der Base schließen, die Wellenlänge der Fluoreszenz auf die Art des eingebauten Nukleotids.

Zur Elektrophorese wird ein etwa 0,4 mm dickes Polyacrylamid-Gel zwischen zwei 25 x 40 cm großen Glasplatten gegossen. Dazu kommt Harnstoff in einem Ansatz von 30%iger Acrylamid-Lösung (Acrylamid: Bisacrylamid in einem Verhältnis 29:1), TBE-Puffer (10%) sowie H<sub>2</sub>O zum Einsatz (Harnstoff nicht über 50°C erwärmen). Die Lösung wird durch einen 0,2 µl Filter filtriert, entgast und anschließend in einem Becherglas von 150 ml Größe mit 15 µl Temed und 350 µl 10%iger APS-Lösung gemischt, wodurch sofort die Polymerisation beginnt. Das flüssige Gel wird direkt zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und ein Kunststoffkamm zur Bildung der Probenschlitze eingesetzt. Während der Auskühlung liegt das Gel für 1-1,5 h in horizontaler Lage. Nach Abschluss der Polymerisation wird das Gel zur Beschickung mit den Proben in den Sequenzer gestellt.

Die präzipitierte DNA wird mit 0,8 µl einer als Ladungspuffer dienenden Mischung aus Formamid und EDTA / Dextranblau (50 mg/ml DB, 25 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Das Verhältnis von Formamid zu EDTA/ DB beträgt fünf zu eins. Ein Erhitzen auf 95°C für 5 min. besorgt die Denaturierung, also Trennung der Stränge, danach bleiben die Proben zur Abkühlung auf Eis. 0,7 µl der so vorbereiteten Proben werden auf das Gel im DNA-Sequenzer gegeben. Die Elektrophorese beginnt nach dem Einfüllen einer 10%igen TBE-Puffer-Lösung in die Elektrophoresekammern. Dabei erfolgt die bekannte Trennung durch Laufweitendifferenzen aufgrund unterschiedlicher Fragmentlängen.

Zur Auswertung der Information durch die Fluoreszenzmarkierung kommt ein Argonionenlaser zur Anwendung. Über ein optisches System aus Linsen zur Fokussierung und mehreren Spiegeln zur Ablenkung wird der Strahl im Winkel von 95° auf das Gel gelenkt. Die markierten Didesoxynukleotide im Strahlengang werden unter der Lichteinwirkung angeregt und emittieren ihrerseits Licht bestimmter Wellenlänge (Fluoreszenz). Diese Emission wird über ein weiteres optisches System aus Linsen und Filtern gebündelt und zu einem Spektrographen geleitet, der das Licht nach der Wellenlänge trennt. Eine angeschlossene Charge Coupled Device (CCD) Camera

ermittelt die einfallende Lichtintensität. Die Auswertung der erhaltenen Informationen erfolgt rechnergestützt. Die Software enthält dabei die nötigen Informationen über die verwendeten Dye-Terminatoren, wie deren Emissionsmaxima. Graphisch stellt sich das Ergebnis als Intensitätsverteilung nach der Basenposition dar. Didesoxy-A erscheint als grüne Kurve, Didesoxy-C als blaue, Didesoxy-G schwarz und Didesoxy-T als rote Kurve. Ein steiler Peak entspricht einer hohen Emission an der jeweiligen Stelle und repräsentiert die entsprechende Base.

Die weitere Auswertung wie beispielsweise der Vergleich von Sequenzen erfolgte über die Software SeqMan (DNASTAR, Inc.).

### **2.6.12 Bestimmung der Komplement-Resistenz**

Die Bestimmung der Resistenz gegen Komplement vermittelte Lyse in menschlichem gepoolten Blutserum erfolgte mit einem Serum Bakterizidie Assay.

Für jeden zu bestimmenden Stamm wird eine Übernachtskultur in einem Schüttelinkubator bei 37°C angesetzt. Die Müller-Hinton-Brühe enthält 0,5% BSA, um ein Verklumpen der Bakterien zu verhindern. Die bewachsene Kultur wird bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und die Bakterien in VSB<sup>2+</sup> resuspendiert. Die Suspension wird auf eine optische Dichte von 0,1 bei 660 nm in einem Dr. Lange-Photometer eingestellt und anschließend mit VSB<sup>2+</sup> im Verhältnis 1/1,25 auf etwa  $1,2 \cdot 10^8$  CFU/ml verdünnt. Sterile U-förmige Mikrotiterplatten werden bei Raumtemperatur für eine Stunde mit PBS-BSA befüllt, um später Bakterienadherenz an den Wänden zu verhindern, und für eine Nacht bei 4°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung werden die Platten dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Zur Inokulation kommen 125 µl Bakteriensuspension und ebensoviel HPS. Für jeden Stamm wird eine Leerprobe mit 50% Hitze inaktiviertem (56°C, 30 min.) HPS angelegt. Es folgt eine Inkubation von 3 h bei 37°C in einem Wasserbad. Nach 0, 15, 30, 60, 120 und 180 min. werden Proben von 20 µl entnommen und auf 5%igen Schafsblut-Agarplatten für 18 h bei 37°C bebrütet. Zur Auswertung erfolgen die Auszählung der gewachsenen Kolonien und der Vergleich mit der jeweiligen Leerprobe. Als resistent gelten Stämme, die nach Inkubation von 3 h mehr als 50% Kolonien im Vergleich mit ihrer Leerprobe zeigen. Sensible

Stämme sind solche, die nach einer Stunde weniger als 3% Wachstum zeigen.

Intermediäre Keime liegen in ihrem Wachstum dazwischen.

Keime, die ihr Resultat in der zweiten Testung nicht reproduzierten, konnten nach fünf Bestimmungen eingeordnet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 $\beta$ -Laktamase-Aktivität

Im Cephalosporin Disk Assay erwiesen sich von den 419 gesammelten *M. catarrhalis* Isolaten 385  $\beta$ -Laktamase-positiv. Das entspricht einem Anteil von 92%.

Die Präsenz dieser  $\beta$ -Laktamase produzierenden Isolate variierte von 83 bis 98% in den 13 teilnehmenden Ländern und kein Anstieg der Prävalenz wurde während der Studienzeit beobachtet.

$\beta$ -Laktamase-Aktivität wurde in ähnlicher Häufigkeit bei Isolaten mit nosokomialer und ambulant erworbener Pneumonie gefunden. Dabei spielte das Probenmaterial ebenso wenig wie das Alter des Patienten eine Rolle.

Alle Keime wurden daraufhin auf die Anwesenheit von *bro1* oder *bro2* gescreent. Hierzu wurden die Stämme bezüglich der Promotorregion des *bro*-Gens wie beschrieben sequenziert. Es galt eine Deletion von 21 Bp der Positionen 1712 bis 1732 des *bro*-Gens als Kriterium der Identifikation als *bro2*. Bei dieser Zuordnung wurden zusätzliche Mutationen zunächst nicht berücksichtigt. BRO2- $\beta$ -Laktamasen wurden in 22 entsprechend 5,7% der 385  $\beta$ -Laktamase positiven Isolate gefunden:

02B142	02B143	06B023
07B081	09B071	10B020
10B024	10B125	10B128
10B130	13B104	13B110
17B024	18B077	18B112
18B113	18B116	19B182
20B065	20B070	20B077
20B085		

Diese Isolate kamen aus 10 der 24 teilnehmenden Universitätskliniken in Belgien, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Italien, Polen, Spanien, der Schweiz und England. Die Prävalenz von *bro2* lag bis 1998 bei 5,1%, im Zeitraum danach bei

6,2%. Dem Großteil der  $\beta$ -Laktamase-Produktion, nämlich 94%, liegt das *bro1*-Gen zugrunde, das in Keimen aller Zentren nachgewiesen werden konnte.

Wie erwartet war in allen  $\beta$ -Laktamase-negativen Isolaten kein *bro*-Gen detektierbar. Alle gesammelten *M. catarrhalis*-Stämme konnten auf diese Weise genau einer der drei Gruppen, keine  $\beta$ -Laktamase-Aktivität, BRO-1-Aktivität oder BRO-2-Aktivität, zugeordnet werden.

Die sich ergebende Verteilung nach Disk-Assay und PCR-Screening wird in Tabelle 1 dargestellt.

### 3.2 Sequenzen und Mutationen

Hauptunterscheidungsmerkmal der Gene, die für BRO-1 und BRO-2 codieren, ist die 21-Bp-Deletion in der Promotor-Region der zwei Gene. Zusätzlich unterscheiden sich die upstream-Regionen von *bro1* und *bro2* an 29 Stellen durch Basenmutationen, darunter zwei Abschnitte mit vier und fünf aufeinander folgenden Variationen (Abb. 4). Abbildung 5 zeigt die ermittelten Sequenzen und auftretenden Nukleotidvariationen der Promotorregion für alle BRO-2-Isolate und exemplarisch für 13 BRO-1-Isolate im Vergleich mit den von Bootsma et al. für *bro1* und *bro2* ermittelten Sequenzen.

Es konnte für 16 der 22 BRO-2-Isolate die von Bootsma et al. (Bootsma, van Dijk et al. 1996) beschriebene Sequenz bestätigt werden. Bei sechs Keimen trat eine davon abweichende Sequenz auf. Eine zusätzliche Deletion oder auch eine neue Insertion konnte nicht nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist hier, dass 5 Keime, 10B125, 10B128, 10B130, 19B182 und 20B65, mit einigen punktuellen Abweichungen im Wesentlichen die Sequenz von *bro2* zeigen. 18B112 hingegen entspricht an 25 der 29 unterschiedlichen Stellen der Sequenz von *bro1*, zeichnet sich damit nur durch die 21-Bp-Deletion als BRO-2 zugehörig aus. Es bleiben vier Stellen, an denen der Keim der von Bootsma et al. publizierten *bro2*-Sequenz entspricht: Bp 1583 A, Bp 1586 A, Bp 1595 C und Bp 1601 A. Zusätzlich traten zwei neue Mutationen in Abweichung zu *bro1* und *bro2* auf: Bp 1529 C→T und Bp 1596 G→A. Bei den 5 BRO-2-Keimen führten folgende neue Mutationen punktuell zur *bro1*-Sequenz: Bp 1583 A→C, Bp 1586 G→A, Bp 1590 T→C, Bp 1592 G→C, Bp 1595 T→C und Bp 1601 G→A. Die Mutationen ohne Bezug

zur BRO-1-Gruppe waren: Bp 1589 G→A, Bp 1598 T→C, Bp 1604 T→C, Bp 1610 G→A, Bp 1613 A→G, Bp 1616 C→T, Bp 1619 G→A, Bp 1625 A→G, Bp 1627 A→C, Bp 1736 A→T, Bp 1752 T→G, Bp 1753 A→G, Bp 1754 A→G, Bp 1763 A→G.

Bei 93 der *bro1* enthaltenden 363 Isolate konnten wir die regulatorische Sequenz von Bootsma et al. bestätigen. Kein einziger BRO-1-Produzent zeigte eine Deletion oder Insertion. Neue Mutationen, die punktuell zur *bro2*-Sequenz führten, waren: Bp 1583 C→A, Bp 1586 A→G, Bp 1590 C→T, Bp 1592 C→G, Bp 1595 C→T, Bp 1601 A→G und Bp 1622 G→A. Zusätzlich gab es auch hier weitere Mutationen: Bp 1592 C→T, Bp 1596 G→A, 1598 T→C, Bp 1604 T→C, Bp 1610 G→A, Bp 1613 A→G, Bp 1619 G→A, Bp 1625 A→G und Bp 1627 A→G.

### 3.3 In-vitro-Aktivität der getesteten Antibiotika

Nach Disk-Assay und PCR-Screening ergeben sich drei Gruppen von *M. catarrhalis*-Isolaten: Isolate ohne  $\beta$ -Laktamase-Aktivität (n=34), Isolate mit BRO-1-Aktivität (n=363) und Isolate mit BRO-2-Aktivität (n=22). In der SENTRY-Studie wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren *M.catarrhalis*-Isolate gesammelt und deren MHK-Werte gegenüber gängigen Antibiotika bestimmt. Dazu gehörten insbesondere die MHK-Werte der neueren Antibiotika Telithromycin und Faropenem. Eine Analyse der Daten erfolgte durch Erstellung der MHK-Verteilung innerhalb jeder der drei Gruppen für jedes Antibiotikum. Zur Charakterisierung der Verteilung erfolgt die Angabe der MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte sowie der Bereichsgrenzen der Verteilung. Die Bereichsgrenzen entsprechen dem Minimum und dem Maximum der gemessenen MHK. Die MHK<sub>50</sub> bzw. MHK<sub>90</sub> geben die MHK an, die von mindestens 50 bzw. 90 Prozent der Isolate unterschritten oder gerade erreicht wird. Dementsprechend haben maximal 50% der Isolate einen MHK über der MHK<sub>50</sub> und maximal 10% über der MHK<sub>90</sub>. Die Gegenüberstellung der Verteilungen für jedes Antibiotikum bietet Tabelle 2. Für die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika werden die Verteilungen zusätzlich im Einzelnen in den Tabellen 6-8 angegeben.

Wie erwartet zeigte die  $\beta$ -Laktamase hohe Aktivität gegen Penicillin und Amoxicillin. Die BRO-1-Laktamase war dabei in beiden Fällen deutlich wirksamer. Vor allem im Falle von Amoxicillin lag die MHK<sub>50</sub> für die BRO-2-Gruppe relativ niedrig. Die

Hemmung durch Clavulansäure beider Enzyme führte zu einer vollständigen Angleichung der drei MHK-Verteilungen im Falle des Kombinationspräparates Amoxicillin/Clavulansäure.

Die Aktivität der  $\beta$ -Laktamase gegenüber weiteren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie den Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporinen war weitaus eingeschränkt. Auch die Verteilungen von BRO-1 und BRO-2 unterschieden sich nur diskret. Die BRO-2- und  $\beta$ -Laktamase negativen Isolate zeigten vergleichbare MHK-Werte. Es fanden sich keine Resistenzen gegen Cephalosporine, allenfalls wurden bei Cefprozil, Cefpodoxim und Cefixim einzelne Keime mit angehobenen MHK-Werten gefunden. Mit einem  $MHK_{90}$  von maximal 1  $\mu\text{g/ml}$  in der Gruppe der BRO-1-Isolate war Faropenem unabhängig von der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität gut wirksam gegen *M. catarrhalis*.

Alle getesteten Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika zeigten im Allgemeinen eine gute In-vitro-Aktivität mit durchweg niedrigen  $MHK_{90}$ -Werten. Die Präsenz von  $\beta$ -Laktamase spielte bei ihnen keine Rolle für die Verteilung der MHK-Werte. Im Vergleich der Gruppen waren die  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  identisch.

Dies galt vor allem für die Gruppe der Chinolone. Es fanden sich keine Resistenzen, und alle *M. catarrhalis*-Isolate konnten durch Chinolonkonzentrationen von maximal 1  $\mu\text{g/ml}$  gehemmt werden.

Die Makrolide zeigten sich bei weit über 90% der Isolate als potente Antibiotika. Einige wenige Keime besaßen hier allerdings höhere MHK-Werte von 2-4  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$  und sogar  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  für die Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin bzw. Azitromycin.

Das neuere Ketolid Telithromycin besaß ausnahmslos gute In-vitro-Aktivität.

Auch Tetracyclin und Rifampicin hemmten jegliches Bakterienwachstum bei Konzentrationen von maximal 2 bzw. 1  $\text{mg/ml}$ . Einzelne höhere MHK wurden nicht registriert.

Für die Makrolide gesagtes galt ähnlich für die Kombination von Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Bei genereller Wirksamkeit gegenüber SXT zeigen sich Keime mit MHK-Werten  $> 8\mu\text{g/ml}$  in allen drei Gruppen.

### 3.4 Komplement-Resistenz

Alle 419 *M. catarrhalis*-Isolate wurden auf die Resistenz gegen Komplement getestet. Es ergaben sich dadurch zwei Subpopulationen. Komplement-sensibel waren 19% oder 80 Stämme, resistent also 339 Stämme.

Um das Verhältnis zwischen Komplement-Resistenz und  $\beta$ -Laktamase-Aktivität zu beleuchten wurde in einem zweiten Schritt die sich ergebende Verteilung bzgl. der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität innerhalb der beiden Subpopulationen untersucht und miteinander verglichen. Tabelle 3, die sich in ihrem Layout an Tabelle 1 hält, stellt die prozentuale Verteilung innerhalb der beiden Subpopulationen gegenüber.

Es zeigt sich, dass die Verteilungen in beiden Subpopulationen vergleichbar waren:  $\beta$ -Laktamase-Produktion war in 94% der Komplement-sensiblen und in 91% der Komplement-resistenten Isolate festzustellen. Ein Vergleich der  $\beta$ -Laktamase-Produzenten beider Subpopulationen zeigt das Gleiche: Der Anteil der BRO-2-Isolate unter den  $\beta$ -Laktamase-Produzenten war 6,7 % in der Komplement-sensiblen Gruppe und 5,5 % in der Komplement-resistenten Gruppe. Es fand sich demnach keine Korrelation zwischen Komplement-Resistenz und  $\beta$ -Laktamase-Aktivität.

## 4 Diskussion

### 4.1 $\beta$ -Laktamase-Aktivität

Die Ausbreitung der BRO- $\beta$ -Laktamasen innerhalb der Spezies *M. catarrhalis* bietet einen beispiellosen Verlauf und hat das Interesse an diesem Organismus mehr als nur gefördert. Innerhalb kürzester Zeit hat ihre Prävalenz den Anteil  $\beta$ -Laktamase-positiver *H. influenzae* bei weitem überflügelt (Davies and Maesen 1988; Felmingham, Robbins et al. 1996). Sie sind der Grund dafür, dass in der kalkulierten Therapie von Atemwegsinfektionen die Anwendung von Penicillin, Amoxicillin oder Ampicillin ohne den Zusatz von Laktamaseinhibitoren wie Clavulansäure nicht mehr empfohlen wird (McGregor, Chang et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität europäischer *M. catarrhalis*-Isolate von April 1997 bis Dezember 1999 untersucht. Mit 92% liegt dieses Ergebnis etwas über den ermittelten Werten anderer europäischer Studien, die in den selben Zeitraum fallen: Während des Winters von 1997/98 wurden 556 *M. catarrhalis*-Isolate in den fünf Ländern Frankreich, Deutschland, Italien, Spanien und Großbritannien gesammelt, von denen sich 87,4% als  $\beta$ -Laktamase positiv erwiesen (Sahm, Jones et al. 2000). Eine andere Studie, die während der Monate März bis Juni 1998 in Österreich, Frankreich Deutschland, Italien und der Schweiz durchgeführt wurde, zeichnet 90,3% als  $\beta$ -Laktamase-Produzenten aus (Jones, Staples et al. 2000).

In Tabelle 4 wird versucht die Entwicklung der  $\beta$ -Laktamase-Verbreitung der letzten Jahre für Europa und Nordamerika nachzuzeichnen. Es wird auf die Angabe von Daten des Patienten bzw. Trägers oder der betroffenen Körperregion verzichtet. Wie auch in dieser Arbeit scheint ihr Einfluss auf die Raten von  $\beta$ -Laktamase-Produktion eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In Europa wird die Grenze von 90% einmal schon 1991 durchbrochen, insgesamt bewegen sich die Werte während der 90er Jahre aber erst auf diese Marke zu. Hingegen wurden in Nordamerika zu dieser Zeit in sämtlichen Studien Häufigkeiten für  $\beta$ -Laktamase-Produzenten von über 90% ermittelt. Zum Vergleich werden exemplarisch für die anderen Kontinente Zahlen für Australien, Brasilien, Angola und

Japan angegeben, die in derselben Größenordnung wie die aus Europa oder Nordamerika liegen. Als Spitzenreiter der gezeigten Werte zeigen sich Japan und Brasilien mit allerdings recht kleinem Stichprobenumfang.

Unter Einbezug des Ergebnisses dieser Arbeit von 92% scheint die Verbreitung der BRO- $\beta$ -Laktamase in Europa der in Nordamerika nur noch wenig hinterher zu hinken. Häufigkeiten von 100% oder fast 100% treten nur lokoregionär und meist im Zusammenhang mit niedrigeren Fallzahlen auf (Felmingham, Robbins et al. 1996; Doern, Jones et al. 1999; Critchley, Thornsberry et al. 2000; Zhanel, Karlowsky et al. 2000). In dieser Arbeit wurden in keinem Land ausschließlich positive Stämme isoliert. Die vollständige Verbreitung scheint also auch geographisch begrenzt noch nicht erreicht zu sein. Für therapeutische Zwecke sollte man aber, auch im Hinblick auf die indirekte Pathogenität von *M. catarrhalis*, bei der kalkulierten Therapie mehr denn je von einer generellen Resistenz gegen Penicillin-Antibiotika ausgehen.

Umgekehrt wurden in einigen Zentren nicht einmal 90%  $\beta$ -Laktamase-Produzenten gefunden. Die ermittelten Häufigkeiten reichen in diesem Zusammenhang nicht aus, um die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität zur Identifizierung von *M. catarrhalis* zu verwenden (McGregor, Chang et al. 1998).

Die weitere Entwicklung der  $\beta$ -Laktamase-Verbreitung bleibt abzuwarten. Es wird interessant sein, ob in der Zukunft alle *M. catarrhalis*-Stämme  $\beta$ -Laktamase-Produzenten werden, oder ob etwa als Ausdruck eines Gleichgewichtes zwischen Aquisition und Verlust der *bro*-Gene ein prozentual kleiner Anteil keine  $\beta$ -Laktamase-Aktivität zeigt.

In den meisten Surveillance-Studien wird bei den  $\beta$ -Laktamase-positiven *M. catarrhalis*-Isolaten nicht zwischen BRO-1- und BRO-2-Produzenten differenziert. Hierzu sind umfangreichere Verfahren nötig wie IEF oder molekulargenetische Methoden (du Plessis 2001), was bei entsprechend hohen Fallzahlen mit relativ großem Aufwand verbunden ist. In dieser Arbeit wurde die 21 bp umfassende Deletion des *bro2*-Gens zur Klassifizierung ausgenutzt. Der ermittelte Anteil der BRO-2-Produzenten an allen  $\beta$ -Laktamase-positiven Isolaten von 5,7%, liegt im weltweiten Vergleich innerhalb des Spektrums veröffentlichter Werte, das bei den hier gezeigten Studien von 5 bis 9% reicht. Ein etwas höherer Anteil von 13% wurde während der ersten Jahre des Auftretens von  $\beta$ -Laktamase-positiven *M. catarrhalis*-

Isolaten, nämlich während der ersten Hälfte der 80er Jahre, von Philippon et al. beobachtet (Philippon, Riou et al. 1986).

Es konnte bestätigt werden, dass der Anteil an BRO-2-Produzenten keinen besonderen zeitlich oder geographisch bedingten Variationen unterliegt. In keinem der teilnehmenden Zentren wurde eine Anhäufung beobachtet und die Prävalenz von BRO-2-Produktion zeigte keinen signifikanten Anstieg.

### 4.2 Sequenzen und Mutationen

Die übliche Methode zur Differenzierung zwischen BRO-1 und BRO-2 ist die Isoelektrische Fokussierung, mit der man überhaupt erst auf die Existenz zweier unterschiedlicher Enzyme aufmerksam wurde (McGregor, Chang et al. 1998). BRO-1 und BRO-2 produzieren ein Muster von unterschiedlichen und einheitlichen Hauptbanden, das die Klassifizierung zulässt. Das Auftreten von Satellitenbanden in der IEF ist bei  $\beta$ -Laktamasen nicht ungewöhnlich, multiple Hauptbanden finden sich allerdings selten. Es wurde auf der Basis von Substratprofilen gezeigt, dass die multiplen Hauptbanden der BRO-Enzyme funktionell ein einziges Enzym repräsentieren (Simpson and Plested 1983). Die Autoren schlugen vor, dass die proteolytische Aktivität von ungekochten Enzymextrakten des Ansatzes für die multiplen Hauptbanden verantwortlich ist. Die Natur der Banden ist nicht weiter untersucht worden (McGregor, Chang et al. 1998). Die exakten Bandenpositionen variieren in den Studien je nach verwendetem Extraktionsverfahren, das bei der Interpretation des Bandenmusters immer berücksichtigt werden muss, und nicht immer konnte eine eindeutige Zuordnung getroffen werden (Chaibi, Mugnier et al. 1995; Ejlersen and Skov 1996).

Nichtsdestotrotz konnte 1991 aufgrund eines neuen Bandenpatterns ein weiteres Enzym BRO-3 beschrieben werden, das eine ähnliche biologische Aktivität wie BRO-1 und BRO-2 besitzt (Christensen, Keiding et al. 1991). Ein solcher Fund wurde in keiner der gesichteten Studien wiederholt, wäre in dieser Arbeit allerdings auch der Detektion entgangen, da das *bro*-Gen nicht selbst sequenziert wurde und so Veränderungen auf Ebene der Aminosäuresequenz mit konsekutiv mutmaßlich abweichendem Pattern in der IEF nicht erfasst werden konnten.

Bootsma et al. gelang die molekulare Charakterisierung des *bro*-Gens (Bootsma, van Dijk et al. 1996). Knock-out-Mutanten, bei denen *bro* durch die Insertion einer Kanamycin-Kassette inaktiviert wurde, verloren jegliche  $\beta$ -Laktamase-Aktivität und Ampicillin-Resistenz, woraus die Autoren schlossen, dass das *bro*-Gen allein jegliche  $\beta$ -Laktamase-Aktivität vermittelt. Damit zeigt die Detektion eines PCR-Produktes bei der Amplifizierung der regulatorischen Region die  $\beta$ -Laktamase-Produktion an. Dies steht in Einklang mit den übereinstimmenden Ergebnissen von PCR-Screening und Disk-Assay.

Weiterhin zeigten Bootsma et al., dass sich zwei Stämme mit BRO-1- bzw. BRO-2-Bandenmuster in der IEF auf chromosomaler Ebene vor allem im Bereich der Promotorregion unterscheiden. Diese Abweichungen werden für die Unterschiede im biologischen Verhalten verantwortlich gemacht, das in der durchweg beobachteten niedrigeren Aktivität des BRO-2-Enzyms bei identischem Substrat- und Hemmungsprofil besteht. Vor diesem Hintergrund erscheint die Sequenzierung der upstream-Region des *bro*-Gens als prädisponiert zur unproblematischen Klassifizierung der untersuchten *M. catarrhalis*-Isolate als BRO-1- bzw. BRO-2-Produzent und darüber hinaus zur Erfassung weiterer Veränderungen der Gensequenz.

Richter et al. untersuchten die MHK von 202 und 201 *M. catarrhalis*-Isolaten, die während der Jahre 1994/95 bzw. 1997/98 gesammelt wurden, gegenüber Ampicillin getrennt für BRO-1- und BRO-2-Produzenten (Richter, Winokur et al. 2000): MHK-Werte größer 1  $\mu$ g/ml fanden sich nur bei den BRO-1 produzierenden Stämmen. Dieser Anteil machte allerdings weniger als 15% während beider Beobachtungszeiträume aus. Der weit überwiegende Anteil zeigte damit keine höheren MHK-Werte als die Gruppe der BRO-2-Produzenten. Es wurde daher vermutet, dass die Sequenzierung einer größeren Anzahl von BRO-1 und BRO-2 produzierenden Stämmen mit ähnlich weitem MHK-Spektrum zusätzliche Mutationen und Deletionen offenbart, die die Unterschiede bzw. Nivellierungen im Resistenzverhalten erklären. Eine enge Korrelation zwischen solchen Variationen der regulatorischen Region und den beobachteten MHK würde zusätzlich die Hypothese stützen, dass die beschriebenen Unterschiede der Promotorregionen von *bro1* und *bro2* tatsächlich für die Aktivitätsunterschiede der BRO- $\beta$ -Laktamasen und auch für das unterschiedliche Resistenzverhalten verantwortlich sind.

Die Tabellen 3, 5 und 6 präsentieren die ermittelten Verteilungen der MHK für Penicillin und Amoxicillin. BRO-2 ist zwar im Allgemeinen mit einer niedrigeren Resistenz als BRO-1 assoziiert, wie man an den niedrigeren  $MHK_{50}$ -Werten erkennt. Es treten aber in sämtlichen getesteten MHK-Stufen sowohl BRO-1 als auch BRO-2-Produzenten auf. Die MHK-Verteilung weist im Gegensatz zu den von Richter et al. publizierten Ergebnissen innerhalb des getesteten Bereiches keine obere Grenze auf. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass in der Untersuchung von Richter et al. die Isolate mit den MHK-Stufen 2 bis 16  $\mu\text{g/ml}$  in der Differenzierung nach BRO-1 und BRO-2 unterrepräsentiert waren, was einen Einfluss auf die Detektion relativ seltener BRO-2-Produzenten oberhalb 2  $\mu\text{g/ml}$  gehabt haben könnte. Ferner werden aus diesem Grund die ermittelten Anteile in Tabelle 4 nicht erwähnt.

Bei der Sequenzierung der upstream-Region des *bro*-Gen wurden außer der bekannten 21 bp Deletion keine weiteren Deletionen oder Insertionen detektiert. Es trat eine Reihe von bisher nicht beschriebenen Mutationen auf, die weder die vermeintliche ribosomale Bindungsstelle noch die -10- oder -35-Promotorsequenzen betrafen. Sie nehmen offenbar keinen nennenswerten Einfluss auf die beobachteten MHK-Werte.

Tabelle 8 zeigt die MHK-Werte von einigen BRO-1-Produzenten, die Mutationen aufwiesen, und allen BRO-2-Produzenten. Stämme mit Mutationen sind fettgedruckt dargestellt. Die BRO-1-Isolate decken das gesamte getestete Spektrum ab. Dabei war es auch offensichtlich unerheblich, ob der Keim ein oder mehrere Mutationen akquirierte. Die BRO-2 produzierenden Stämme mit Mutationen zeigen ebenfalls sowohl hohe als auch niedrige MHK-Werte.

Die Isolate 02B005, 13B088, 14B140, 14B162 und 14B163 haben alle die gleiche Mutation 1598 T→C und unterscheiden sich hinsichtlich des sequenzierten Bereichs nicht (vgl. Abb. 4). Die MHK-Werte variieren für Penicillin und Amoxicillin um 3-4 Dilutionsstufen.

Das Isolat 18B112 ist in sofern interessant, als dass es die *bro2* typische 21 bp Deletion enthält, an den meisten anderen Stellen einschließlich der beiden vier und fünf Bp umfassenden Variationen aber, die Sequenz von *bro1* besitzt. Nach der derzeitigen Auffassung von der 21-bp-Deletion, sollte dieser Keim entsprechende niedrige  $\beta$ -Laktamase-Aktivität exprimieren. Die MHK-Werte für Penicillin und Amoxicillin liegen eher im unteren Bereich. Weitere Schlüsse, die auf die

Charakterisierung der 21 bp Deletion abzielen, sind jedoch bei dem weiten MHK-Spektrum, welches sowohl BRO-1- als auch BRO-2-Isolate zeigen, ohne zusätzliche Untersuchungen nicht zulässig.

Es muss daher resümiert werden, dass die beobachteten Mutationen offenbar keinen Einfluss auf die MHK-Werte der getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika haben und dass die vorgestellten Daten keine neuen Schlüsse im Hinblick auf die Charakterisierung der 21-bp-deletion zulassen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Mutationen existieren, die, möglicherweise durch Einbezug der für die Promotoraktivität relevanten Gen-Abschnitte, die Antibiotikaresistenz beeinflussen können.

Ohne solche Mutationen fällt es schwer, die MHK-Verteilungen für BRO-1- und BRO-2-Isolate lediglich durch die 21-bp-Deletion mit daraus resultierender niedriger Enzymaktivität für BRO-2 zu erklären. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen damit nahe, dass es weitere unbekannte Faktoren gibt, die die exprimierte  $\beta$ -Laktamase-Aktivität noch modulieren und gegebenenfalls steigern können: Eine obere Grenze der MHK für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika von BRO-2-Produzenten ist innerhalb des getesteten Bereichs im Gegensatz zur Untersuchung von Richter et al. nicht beobachtet worden.

Über die Vermutung zusätzlicher Faktoren hinaus gehen die Vorschläge von Walker et al. (Walker, Neal et al. 2000), die in einem einzigen Krankenhaus über einen Zeitraum von 10 Jahren die Trends im Resistenzverhalten von *M. catarrhalis*-Isolaten retrospektiv untersuchten. Von 1984 bis 1994 stieg die Prävalenz der  $\beta$ -Laktamase-Produktion von 30 auf 96% an. Nicht für alle Antibiotika konnte die abnehmende Sensibilität von *M. catarrhalis* durch die zunehmende Häufigkeit  $\beta$ -Laktamase-positiver Isolate erklärt werden. Walker et al. schlossen, dass für die Zunahme der MHK-Werte gegenüber Imipenem und der Kombination Amoxicillin/Clavulansäure innerhalb der Gruppe der positiven Isolate andere Formen der  $\beta$ -Laktamase,  $\beta$ -Laktamase abhängige Modifikatoren und/oder zusätzliche Faktoren verantwortlich sein müssen (Verduin, Hol et al. 2002).

Diese Vorschläge weichen die bisherige Vorstellung über die Genese der  $\beta$ -Laktam-Resistenz aufgrund eines einzigen Gens mit variabler Promotoraktivität auf. Die zukünftige Forschung muss zeigen, welcher Art die vermuteten zusätzlichen Faktoren sind und ob bzw. in welchem Ausmaß das Konzept der BRO- $\beta$ -Laktamasen erweitert oder modifiziert werden muss.

### 4.3 In-vitro-Aktivität der getesteten Antibiotika

In Übereinstimmung mit anderen europäischen Studien (Jones, Staples et al. 2000; Sahm, Jones et al. 2000) zeigt sich, dass die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität den einzig bedeutsamen Resistenzmechanismus der europäischen *M. catarrhalis*-Isolate darstellt:  $\beta$ -Laktamase-negative Isolate erweisen sich sensibel gegenüber Penicillin und Amoxi-cillin und bei der Kombination von Amoxicillin/Clavulansäure gleichen sich die Verteilungen der drei Gruppen an.

Die wenigsten Studien differenzieren nach der BRO- $\beta$ -Laktamase-Aktivität in drei Gruppen, nicht selten wird die Gesamtheit aller isolierten *M. catarrhalis* untersucht. Für die non- $\beta$ -Laktam-Antibiotika ergeben sich daraus keine Schwierigkeiten für den Vergleich von Ergebnissen: Die Zugehörigkeit zu einer der drei Gruppen hatte keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten. Alle getesteten non- $\beta$ -Laktam-Antibiotika ergaben durchweg niedrige MHK<sub>90</sub>-Werte. Zum Teil wurde von einigen wenigen Isolaten eine Neigung zu höheren MHK-Werten registriert.

Die beobachtete hohe Aktivität der  $\beta$ -Laktamase gegenüber Penicillin hat sich in Europa in den letzten Jahren nicht wesentlich verändert: Publierte MHK<sub>50</sub>/MHK<sub>90</sub> liegen bei 4/8  $\mu\text{g/ml}$  (Ahmad, McLeod et al. 1984) während der 80er Jahre, die etwa vergleichbar sind mit Werten in den USA von 1/8  $\mu\text{g/ml}$  1987/88 (Jorgensen, Doern et al. 1990) und 8/16  $\mu\text{g/ml}$  1993 (Berk and Kalbfleisch 1996). Häufiger werden vor allem in neueren Jahren Angaben für die Aminopenicilline gemacht. Für Amoxicillin werden MHK<sub>50</sub>/MHK<sub>90</sub> von 0,25/4  $\mu\text{g/ml}$  1993 für Europa und 1/4  $\mu\text{g/ml}$  für USA (Berk and Kalbfleisch 1996), später 2/8  $\mu\text{g/ml}$  1999 in den USA (Jones and Pfaller 2000). Bei diesen Werten wird nicht nach  $\beta$ -Laktamase-Produktion differenziert, was die Vergleichbarkeit erschwert.

Insgesamt imponieren die Variationen als zu klein, um Aussagen betreffend einer Tendenz im Resistenzverhalten gegenüber den beiden Antibiotika zu treffen.

Die vielfach beschriebene Beobachtung von kleineren MHK für die Aminopenicilline verglichen mit Penicillin, auch als relative Sensibilität bezeichnet, wird auf die Gruppe der BRO-2-Produzenten zurückgeführt (Farmer and Reading 1982; Stobberingh, van Eck et al. 1986). So liegt die MHK<sub>50</sub> der BRO-2-Produzenten mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$  8fach entsprechend 3 Dilutionsstufen unter dem der BRO-1-Isolate. 17% aller  $\beta$ -Laktamase-positiven Isolate zeigten Amoxicillin-MHK  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ . Das NCCLS schlägt

keine Grenzwerte für Mikrodilutionsstufen bei der MHK-Testung für *M. catarrhalis* vor. Bezug nehmend auf die gegenwärtig empfohlenen Interpretationskriterien für *H. influenza* sollten solche Isolate als empfindlich gegen Ampicillin eingestuft werden. Die niedrige Aktivität der  $\beta$ -Laktamasen gegenüber der gesamten Gruppe der Cephalosporine unterstreicht einmal mehr deren Substratprofil als „Penicillinasen“ (Labia, Barthelemy et al. 1986). Die BRO-2-Isolate zeigten keine messbaren Differenzen der MHK-Verteilung verglichen mit den Stämmen ohne  $\beta$ -Laktamase-Aktivität.

Wie schon von Doern et al. (Doern, Brueggemann et al. 1996) beschrieben, zeichnete sich Cefixim durch die niedrigsten MHK-Werte aller Cephalosporine aus. Legt man die Kriterien des NCCLS für MHK-Bestimmungen bei anspruchlosen Keimen mit schnellem Wachstum in Müller-Hinton-Medium zugrunde (Tabelle 9), so müssten einzelne Keime bezüglich Cefprozil, Cefpodoxim und Cefixim als intermediär-resistent eingestuft werden. Über die Resistenz gegenüber Cefaclor war bereits berichtet worden (Felmingham, Robbins et al. 1996).

Ausgezeichnete Wirkung besitzen die getesteten Chinolone. Alle isolierten Stämme konnten in Übereinstimmung mit anderen Studien (Deshpande and Jones 2000; Marchese, Debbia et al. 2000; McCloskey, Moore et al. 2000; Rittenhouse, McCloskey et al. 2000) durch Konzentrationen von maximal 1  $\mu\text{g/ml}$  gehemmt werden. Bei den neueren Präparaten Moxifloxacin und Gemifloxacin sowie ferner Grepafloxacin wurden 0,12  $\mu\text{g/ml}$  nicht überschritten. Sehr seltene resistente Isolate wurden in der US-SENTRY-Studie beschrieben, deren Auftreten bei Risikopatienten mit ernster Pneumonie bei reduziertem Immunstatus und ungenügender Medikamentencompliance registriert wurde (DiPersio, Jones et al. 1998).

Die Resistenz von Tetracyclin und Erythromycin wurde bei US-amerikanischen *M. catarrhalis*-Isolaten beschrieben (Brown, Wallace et al. 1989; Roberts, Brown et al. 1990). Einige der hier untersuchten Keime erreichten ähnlich hohe MHK-Werte: Weniger als 10 Keime mit MHK von 2-4  $\mu\text{g/ml}$  gegen Erythromycin und Clarithromycin müssten nach den NCCLS-Kriterien für anspruchlose Keimen mit schnellem Wachstum in Müller-Hinton-Medium der intermediären Gruppe zugeordnet werden. Darunter befanden sich auch 3 Keime mit einer MHK gegen Azithromycin von >16  $\mu\text{g/ml}$ . Keines dieser Isolate entstammt der BRO-2-Gruppierung, was aber wahrscheinlich der niedrigeren Prävalenz von *bro2* zugeschrieben werden muss.

Tetracyclin- oder Rifampicin-Resistenzen kamen bei den untersuchten europäischen *M. catarrhalis*-Isolaten nicht vor. Ebenso zeigt das Ketolid Telithromycin wie erwartet gute In-vitro-Aktivität (Pankuch, Hoellman et al. 1998).

Das Verhalten europäischer Isolate gegenüber der Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazol weist keine neuen Aspekte auf. Wie in früheren Studien lagen die  $MHK_{50}/MHK_{90}$ -Werte bei 0,5/0,5 (Berk and Kalbfleisch 1996). Ein Trend zu höheren MHK von 8 µg/ml und größer (vgl. Tabelle 9) scheint sich abzuzeichnen, wodurch ein kleiner Anteil resistenter Isolate ausgemacht wird (Felmingham, Robbins et al. 1996; McGregor, Chang et al. 1998).

Trotz der hohen Prävalenz der BRO- $\beta$ -Laktamasen von inzwischen über 90% sollte die Therapie bei bekannter *M. catarrhalis*-Infektion des Respirationstraktes aufgrund der offensichtlich großen Auswahl wirksamer Cephalosporine und non- $\beta$ -Laktam-Antibiotika keine Probleme bereiten. Bei einigen Keimen mussten höhere MHK festgestellt werden, eine größere Gruppierung mit einheitlichem resistantem Verhalten trat jedoch nicht auf. Möglicherweise können Chinolon-Präparate wichtige Reserve-Antibiotika bei den immer wieder selten beobachteten Resistenzen (McGregor, Chang et al. 1998) darstellen.

Bei der kalkulierten Therapie von Atemwegsinfektionen muss das Resistenzspektrum der mutmaßlich involvierten Organismen wie *H. influenzae* und *S. pneumoniae* in die Überlegungen mit einbezogen werden. Jorgensen et al. (Jorgensen, Doern et al. 1990) stellten 1996 in diesem Zusammenhang neben anderen die tatsächlich häufig verwendeten Substanzen Amoxicillin/Clavulansäure und Cefuroxim heraus, was aus der Sicht dieser Studie aufgrund des wenig veränderten Resistenzspektrums der europäischen *M. catarrhalis*-Isolate bestätigt werden kann. Das fehlende Auftreten neuer größerer resistenter Populationen oder ausgeprägter Kreuzresistenzen ist ein erfreuliches Ergebnis. Es sollte der Surveillance der folgenden Jahre möglich sein die Entwicklung und Ausbreitung entsprechender Resistenzmechanismen frühzeitig zu erkennen und damit zum rechten Zeitpunkt erforderliche Empfehlungen für die antimikrobielle Therapie auszusprechen, mit dem Ziel, die Versagensquote kalkulierter Behandlung im klinischen Alltag zu minimieren.

#### 4.4 Komplement-Resistenz

Von den 419 untersuchten *M. catarrhalis*-Isolaten waren 81% gegen die Komplement vermittelte Lyse resistent.

Der Anteil Komplement-resistenter Isolate ist größeren Variationen unterworfen als die Prävalenz der BRO- $\beta$ -Laktamasen und korreliert in stärkerem Maße mit dem Alter des Patienten bzw. Trägers, dem Krankheitszustand und dem Probenmaterial (Hol, Verduin et al. 1995; Murphy, Fitzgerald et al. 1997). Der ermittelte Prozentsatz steht in seiner Höhe im Einklang mit der Bedeutung der Komplement-Resistenz als Virulenzfaktor und entspricht für Patienten mit einer Infektion des Respiratorstraktes den Erwartungen.

Bei der automatischen Ribotypisierung mittels eines Qualicon RiboPrinter von Verduin et al. wurden die untersuchten *M. catarrhalis*-Isolate in zwei Subpopulationen separiert, von denen sich die eine als Komplement-sensibel, die andere als Komplement-resistent erwies. Die Ergebnisse wurden durch Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) und Analyse von Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) bestätigt (Verduin, Kools-Sijmons et al. 2000). Etwa zur gleichen Zeit machen Bootsma et al. ähnliche Entdeckungen: Zwei Virulenzfaktoren, darunter die Komplement-Resistenz, sind streng mit einer der beiden durch zwei unterschiedlich RFLP-Analysen charakterisierten Subspezies assoziiert (Bootsma, van der Heide et al. 2000). Dagegen fand sich  $\beta$ -Laktamase-Produktion in beiden Subpopulationen, was im Einklang mit der Vermutung eines horizontalen Transfers steht, der die schnelle Ausbreitung der BRO- $\beta$ -Laktamasen erklärt. Die Arbeitsgruppe hat viel zur Aufklärung der Herkunft und Verbreitung beigetragen und sah sich in der Lage die einzelnen Schritte der Aquisition und Übertragung nachzuzeichnen (Bootsma, van Dijk et al. 2000). Demnach stammt BRO-2 als Lipoprotein aus einem bis dato unbekanntem aber wahrscheinlich gram-positiven Organismus. Das codierende Gen wurde zufällig in das Genom von *M. catarrhalis* übertragen, dessen übriger G-C-Anteil signifikant höher liegt als in *bro2*. *bro1* geht durch Verdopplung einer Basensequenz von bekannten 21 bp aus *bro2* hervor und erlangt damit durch eine höhere Promotoraktivität die Prädominanz über beide Typen. Die Übertragung innerhalb der Spezies erfolgt über Transformation. Dabei sorgt ein flankierender nicht-codierender Sequenzabschnitt für die Insertion an der

immer wieder identischen Position zwischen *orf1* und *orf3* (Bootsma, van Dijk et al. 1996).

Vor diesem Hintergrund konnte diese Arbeit für die isolierten europäischen *M. catarrhalis*-Stämme zeigen, dass die Prävalenz der BRO- $\beta$ -Laktamase-Produktion nicht mit der Resistenz gegenüber Komplement korreliert ist. Die Verteilung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität auch differenziert nach *bro1* und *bro2* innerhalb der beiden Subpopulationen Komplement-resistenter und Komplement-sensibler Stämme ist vergleichbar, wie Tabelle 3 offenbart. Unter der Voraussetzung, dass Komplement-resistente Stämme eine genetisch eigenständige Linie bilden, stützen diese Ergebnisse die Hypothese eines horizontalen Transfers der BRO- $\beta$ -Laktamasen.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich auf molekulargenetischer Ebene mit den  $\beta$ -Laktamasen von 419 *M. catarrhalis*-Isolaten, die während der europäischen SENTRY-Surveillancestudie von 1997-1999 gesammelt wurden, analysierte differenziert nach  $\beta$ -Laktamase-Aktivität deren Resistenzverhalten gegenüber 29 antimikrobiellen Substanzen und untersuchte den Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Laktamase-Produktion und Komplement-Resistenz.

Von den 419 gesammelten Stämmen erwiesen sich 385 (92%) als  $\beta$ -Laktamase-positiv. Dieser Anteil liegt nur noch gering unter den publizierten Werten US-amerikanischer Studien. Das Verhältnis zwischen BRO-1- und BRO-2-Produzenten belief sich auf 94,3 zu 5,7% und hat sich während der letzten Jahre offensichtlich nicht wesentlich geändert.

In der Analyse der In-vitro-Aktivität der 29 verschiedenen Antibiotika präsentierten sich die BRO- $\beta$ -Laktamasen als einzig bedeutender Resistenzmechanismus. BRO-1-Isolate waren im Mittel resistenter gegen Penicilline und in geringerem Umfang gegen Cephalosporine als die BRO-2-produzierenden Stämme. Dafür werden die Variationen in der up-stream-Region des codierenden *bro*-Gens, insbesondere der 21-bp Deletion/Insertion, mit konsekutiv unterschiedlicher Promotoraktivität verantwortlich gemacht. Die zusätzlichen neuen Mutationen hatten keinen Effekt auf die MHK-Verteilungen unter den BRO-1- und BRO-2-Produzenten, zu deren Erklärung die Existenz zusätzlicher Faktoren vermutet wird, welche die exprimierte  $\beta$ -Laktamase-Aktivität noch modifizieren.

Beide  $\beta$ -Laktamasen wurden durch Clavulansäure so gut wie vollständig inhibiert.

Einige wenige Keime mit höheren MHK-Werten gegenüber Non- $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie SXT und Azithromycin wurden gefunden, der Ausbruch und die stärkere Verbreitung eines weiteren Resistenzmechanismus sind bisher jedoch unterblieben.

19% der getesteten Stämme waren Komplement-sensibel. Da die Verteilung der  $\beta$ -Laktamase-negativen sowie der BRO-1- und BRO-2-Produzenten vergleichbar in beiden Komplementpopulationen waren, ist die Antibiotikaresistenz nicht mit der potentiellen phylogenetischen Abstammung von Subpopulationen der Spezies verknüpft.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahmad, F., D. T. McLeod, et al. (1984). "Antimicrobial susceptibility of Branhamella catarrhalis isolates from bronchopulmonary infections." Antimicrob Agents Chemother **26**(3): 424-5.

Ahmad, F., D. T. McLeod, et al. (1985). "Branhamella catarrhalis prevalence in a hospital population." J Hosp Infect **6**(1): 71-4.

Ahmad, F., H. Young, et al. (1987). "Characterisation of Branhamella catarrhalis and differentiation from Neisseria species in a diagnostic laboratory." J Clin Pathol **40**(11): 1369-73.

Aitken, J. M. and P. E. Thornley (1983). "Isolation of Branhamella catarrhalis from sputum and tracheal aspirate." J Clin Microbiol **18**(5): 1262-3.

Arola, M., O. Ruuskanen, et al. (1990). "Clinical role of respiratory virus infection in acute otitis media." Pediatrics **86**(6): 848-55.

Barry, A. L., M. A. Pfaller, et al. (1994). "In vitro activities of 12 orally administered antimicrobial agents against four species of bacterial respiratory pathogens from U.S. Medical Centers in 1992 and 1993." Antimicrob Agents Chemother **38**(10): 2419-25.

Berk, S. L. (1990). "From Micrococcus to Moraxella. The reemergence of Branhamella catarrhalis." Arch Intern Med **150**(11): 2254-7.

Berk, S. L. and J. H. Kalbfleisch (1996). "Antibiotic susceptibility patterns of community-acquired respiratory isolates of *Moraxella catarrhalis* in western Europe and in the USA. The Alexander Project Collaborative Group." J Antimicrob Chemother **38 Suppl A**: 85-96.

Blackwell, C., H. Young, et al. (1978). "Isolation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria catarrhalis* from the genitourinary tract and anal canal." Br J Vener Dis **54**(1): 41-4.

Bootsma, H. J., P. C. Aerts, et al. (1999). "Moraxella (*Branhamella*) *catarrhalis* BRO beta-lactamase: a lipoprotein of gram-positive origin?" J Bacteriol **181**(16): 5090-3.

Bootsma, H. J., H. G. van der Heide, et al. (2000). "Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits." J Infect Dis **181**(4): 1376-87.

Bootsma, H. J., H. van Dijk, et al. (2000). "Genesis of BRO beta-lactamase-producing *Moraxella catarrhalis*: evidence for transformation-mediated horizontal transfer." Mol Microbiol **36**(1): 93-104.

Bootsma, H. J., H. van Dijk, et al. (1996). "Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 966-72.

Bovre, K. (1984). The genus *Moraxella*. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Baltimore, USA, Williams and Wilkins, Krieg NR, Holt JG (eds). **vol. 1.:** 296-303.

Brorson, J. E. and B. E. Malmvall (1981). "Branhamella catarrhalis and other bacteria in the nasopharynx of children with longstanding cough." Scand J Infect Dis **13**(2): 111-3.

Brown, B. A., R. J. Wallace, Jr., et al. (1989). "Tetracycline and erythromycin resistance among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis*." Antimicrob Agents Chemother **33**(9): 1631-3.

Calder, M. A., M. J. Croughan, et al. (1986). "The incidence and antibiotic susceptibility of *Branhamella catarrhalis* in respiratory infections." Drugs **31 Suppl 3**: 11-6.

Catlin, B. W. (1970). "Transfer of the organism named *Neisseria catarrhalis* to *Branhamella* gen. nov." Int J Syst Bacteriol **43**: 210-220.

Chaibi, E. B., P. Mugnier, et al. (1995). "[beta-Lactamases of *Branhamella catarrhalis* and their phenotypic implications]." Res Microbiol **146**(9): 761-71.

Chapman, A. J., Jr., D. M. Musher, et al. (1985). "Development of bactericidal antibody during *Branhamella catarrhalis* infection." J Infect Dis **151**(5): 878-82.

Chong, C. Y., W. H. Lim, et al. (1997). "The changing trend in the pattern of infective etiologies in childhood acute lower respiratory tract infection." Acta Paediatr Jpn **39**(3): 317-21.

Choo, P. W. and N. M. Gantz (1989). "Branhamella catarrhalis pneumonia with bacteremia." South Med J **82**(10): 1317-8.

Christensen, J. J., J. Keiding, et al. (1990). "Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase characterization of Branhamella catarrhalis isolates from 1983/1984 and 1988." Apmis **98**(11): 1039-44.

Christensen, J. J., J. Keiding, et al. (1991). "Recognition of a new Branhamella catarrhalis beta-lactamase--BRO-3." J Antimicrob Chemother **28**(5): 774-5.

Collazos, J., J. de Miguel, et al. (1992). "Moraxella catarrhalis bacteremic pneumonia in adults: two cases and review of the literature." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **11**(3): 237-40.

Critchley, I. A., C. Thornsberry, et al. (2000). "Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis collected from five centers in Brazil, 1997-98." Clin Microbiol Infect **6**(4): 178-84.

Darelid, J., S. Lofgren, et al. (1993). "Erythromycin treatment is beneficial for longstanding Moraxella catarrhalis associated cough in children." Scand J Infect Dis **25**(3): 323-9.

Davies, B. I. and F. P. Maesen (1988). "The epidemiology of respiratory tract pathogens in southern Netherlands." Eur Respir J **1**(5): 415-20.

Deshpande, L. M. and R. N. Jones (2000). "Antimicrobial activity of advanced-spectrum fluoroquinolones tested against more than 2000 contemporary bacterial isolates of species causing community-acquired respiratory tract infections in the United States (1999)." Diagn Microbiol Infect Dis **37**(2): 139-42.

Diamond, L. A. and B. Lorber (1984). "Branhamella catarrhalis pneumonia and immunoglobulin abnormalities: a new association." Am Rev Respir Dis **129**(5): 876-8.

Dickinson, D. P., B. G. Loos, et al. (1988). "Restriction fragment mapping of Branhamella catarrhalis: a new tool for studying the epidemiology of this middle ear pathogen." J Infect Dis **158**(1): 205-8.

DiPersio, J. R., R. N. Jones, et al. (1998). "Fluoroquinolone-resistant Moraxella catarrhalis in a patient with pneumonia: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998)." Diagn Microbiol Infect Dis **32**(2): 131-5.

Doern, G. V., A. B. Brueggemann, et al. (1996). "Prevalence of antimicrobial resistance among 723 outpatient clinical isolates of Moraxella catarrhalis in the United States in 1994 and 1995: results of a 30-center national surveillance study." Antimicrob Agents Chemother **40**(12): 2884-6.

Doern, G. V., R. N. Jones, et al. (1999). "Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis from patients with community-acquired respiratory tract infections:

antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997)." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 385-9.

du Plessis, M. (2001). "Rapid discrimination between BRO beta-lactamases from clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* using restriction endonuclease analysis." Diagn Microbiol Infect Dis **39**(1): 65-7.

Ejlertsen, T. and R. Skov (1996). "The beta-lactamases of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* isolated from Danish children." Apmis **104**(7-8): 557-62.

Ejlertsen, T., E. Thisted, et al. (1994). "*Branhamella catarrhalis* in children and adults. A study of prevalence, time of colonisation, and association with upper and lower respiratory tract infections." J Infect **29**(1): 23-31.

Ejlertsen, T., E. Thisted, et al. (1994). "Maternal antibodies and acquired serological response to *Moraxella catarrhalis* in children determined by an enzyme-linked immunosorbent assay." Clin Diagn Lab Immunol **1**(4): 464-8.

Enright, M. C., P. E. Carter, et al. (1994). "Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis." Int J Syst Bacteriol **44**(3): 387-91.

Enright, M. C. and H. McKenzie (1997). "*Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*--clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen." J Med Microbiol **46**(5): 360-71.

Faden, H., L. Duffy, et al. (1997). "Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics." J Infect Dis **175**(6): 1440-5.

Faden, H., Y. Harabuchi, et al. (1994). "Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media." J Infect Dis **169**(6): 1312-7.

Farmer, T. and C. Reading (1982). "beta-Lactamases of *Branhamella catarrhalis* and their inhibition by clavulanic acid." Antimicrob Agents Chemother **21**(3): 506-8.

Felmingham, D. and R. N. Gruneberg (1996). "A multicentre collaborative study of the antimicrobial susceptibility of community-acquired, lower respiratory tract pathogens 1992-1993: the Alexander Project." J Antimicrob Chemother **38 Suppl A**: 1-57.

Felmingham, D., M. J. Robbins, et al. (1996). "Antimicrobial susceptibility of community-acquired bacterial lower respiratory tract pathogens." J Antimicrob Chemother **38**(4): 747-51.

Fung, C. P., S. F. Yeo, et al. (1994). "Susceptibility of *Moraxella catarrhalis* isolates to beta-lactam antibiotics in relation to beta-lactamase pattern." J Antimicrob Chemother **33**(2): 215-22.

Hager, H., A. Verghese, et al. (1987). "*Branhamella catarrhalis* respiratory infections." Rev Infect Dis **9**(6): 1140-9.

Helminen, M. E., I. Maciver, et al. (1993). "A mutation affecting expression of a major outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis* alters serum resistance and survival in vivo." J Infect Dis **168**(5): 1194-201.

Henriksen, S. D. (1976). "Moraxella, neisseria, branhamella, and acinetobacter." Annu Rev Microbiol **30**: 63-83.

Hoi-Dang, A. B., C. Brive-Le Bouguenec, et al. (1978). "Novel beta-lactamase from *Branhamella catarrhalis*." Ann Microbiol (Paris) **129 B**(3): 397-406.

Hol, C., E. E. Van Dijke, et al. (1994). "Experimental evidence for *Moraxella*-induced penicillin neutralization in pneumococcal pneumonia." J Infect Dis **170**(6): 1613-6.

Hol, C., C. M. Verduin, et al. (1995). "Complement resistance is a virulence factor of *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*." FEMS Immunol Med Microbiol **11**(3): 207-11.

Ikeda, F., Y. Yokota, et al. (1993). "Characterization of BRO enzymes and beta-lactamase transfer of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* isolated in Japan." Chemotherapy **39**(2): 88-95.

Ikram, R. B., M. Nixon, et al. (1993). "A prospective study of isolation of *Moraxella catarrhalis* in a hospital during the winter months." J Hosp Infect **25**(1): 7-14.

Jones, M. E., A. M. Staples, et al. (2000). "Benchmarking the in vitro activity of moxifloxacin against recent isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella*

catarrhalis, and Haemophilus influenzae. A European multi-centre study." Diagn Microbiol Infect Dis **37**(3): 203-11.

Jones, R. N. and M. A. Pfaller (2000). "In vitro activity of newer fluoroquinolones for respiratory tract infections and emerging patterns of antimicrobial resistance: data from the SENTRY antimicrobial surveillance program." Clin Infect Dis **31 Suppl 2**: S16-23.

Jorgensen, J. H., G. V. Doern, et al. (1990). "Antimicrobial resistance among respiratory isolates of Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, and Streptococcus pneumoniae in the United States." Antimicrob Agents Chemother **34**(11): 2075-80.

Kallings, I., S. Bengtsson, et al. (1983). "Antibiotic sensitivity of Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes and Branhamella catarrhalis isolated from upper respiratory tract infections in Sweden." Scand J Infect Dis Suppl **39**: 100-5.

Karalus, R. and A. Campagnari (2000). "Moraxella catarrhalis: a review of an important human mucosal pathogen." Microbes Infect **2**(5): 547-59.

Klein, J. O. (1994). "Current issues in upper respiratory tract infections in infants and children: rationale for antibacterial therapy." Pediatr Infect Dis J **13**(1 Suppl 1): S5-9; discussion S20-2.

Klein, J. O. (1994). "Otitis media." Clin Infect Dis **19**(5): 823-33.

Klingman, K. L., A. Pye, et al. (1995). "Dynamics of respiratory tract colonization by *Branhamella catarrhalis* in bronchiectasis." Am J Respir Crit Care Med **152**(3): 1072-8.

Knapp, J. S. and R. J. Rice (1995). *Neisseria* and *Branhamella*. Manual of Clinical Microbiology 1995, 6th ed., ASM Press. Washington D.C., P. R. Murray, M. A. Baron, E. J. Tenover, F. C. Tenover, R. H. Tenover: 324-340.

Labia, R., M. Barthelemy, et al. (1986). "Classification of beta-lactamases from *Branhamella catarrhalis* in relation to penicillinases produced by other bacterial species." Drugs **31 Suppl 3**: 40-7.

Marchese, A., E. A. Debbia, et al. (2000). "Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander Project." J Antimicrob Chemother **46 Suppl T1**: 11-5.

McCloskey, L., T. Moore, et al. (2000). "In vitro activity of gemifloxacin against a broad range of recent clinical isolates from the USA." J Antimicrob Chemother **45 Suppl 1**: 13-21.

McGregor, K., B. J. Chang, et al. (1998). "Moraxella catarrhalis: clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **17**(4): 219-34.

McLeod, D. T., F. Ahmad, et al. (1986). "Increase in bronchopulmonary infection due to *Branhamella catarrhalis*." Br Med J (Clin Res Ed) **292**(6528): 1103-5.

McNeely, D. J., C. S. Kitchens, et al. (1976). "Fatal *Neisseria* (*Branhamella*) *catarrhalis* pneumonia in an immunodeficient host." Am Rev Respir Dis **114**(2): 399-402.

Murphy, S., M. Fitzgerald, et al. (1997). "Studies on haemagglutination and serum resistance status of strains of *Moraxella catarrhalis* isolated from the elderly." Gerontology **43**(5): 277-82.

Murphy, T. F. (1996). "*Branhamella catarrhalis*: epidemiology, surface antigenic structure, and immune response." Microbiol Rev **60**(2): 267-79.

Murphy, T. F. and S. Sethi (1992). "Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease." Am Rev Respir Dis **146**(4): 1067-83.

Nash, D. R., R. J. Wallace, Jr., et al. (1986). "Isoelectric focusing of beta-lactamases from sputum and middle ear isolates of *Branhamella catarrhalis* recovered in the United States." Drugs **31 Suppl 3**: 48-54.

Nicotra, B., M. Rivera, et al. (1986). "*Branhamella catarrhalis* as a lower respiratory tract pathogen in patients with chronic lung disease." Arch Intern Med **146**(5): 890-3.

Ninane, G., J. Joly, et al. (1978). "Bronchopulmonary infection due to beta-lactamase-producing *Branhamella catarrhalis* treated with amoxicillin/clavulanic-acid." Lancet **2**(8083): 257.

Pankuch, G. A., D. B. Hoellman, et al. (1998). "Activity of HMR 3647 compared to those of five agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* by MIC determination and time-kill assay." Antimicrob Agents Chemother **42**(11): 3032-4.

Peiris, V., K. Ralphson, et al. (1993). "Not *Branhamella catarrhalis*: misidentification of oxidase-positive, Gram-negative cocci isolated from the genital tract." J Infect **27**(3): 338-9.

Pettersson, B., A. Kodjo, et al. (1998). "Phylogeny of the family Moraxellaceae by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 1**: 75-89.

Philippon, A., J. Y. Riou, et al. (1986). "Detection, distribution and inhibition of *Branhamella catarrhalis* beta-lactamases." Drugs **31 Suppl 3**: 64-9.

Richter, S. S., P. L. Winokur, et al. (2000). "Molecular characterization of the beta-lactamases from clinical isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* obtained from 24 U.S. medical centers during 1994-1995 and 1997-1998." Antimicrob Agents Chemother **44**(2): 444-6.

Riley, T. V. (1987). "A note on hydrolysis of tributyrin by Branhamella and Neisseria." J Appl Bacteriol **62**(6): 539-42.

Rittenhouse, S., L. McCloskey, et al. (2000). "In vitro antibacterial activity of gemifloxacin and comparator compounds against common respiratory pathogens." J Antimicrob Chemother **45 Suppl 1**: 23-7.

Roberts, M. C., B. A. Brown, et al. (1990). "Genetic basis of tetracycline resistance in Moraxella (Branhamella) catarrhalis." Antimicrob Agents Chemother **34**(9): 1816-8.

Rossau, R., A. Van Landschoot, et al. (1991). "Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera Moraxell, Acinetobacter and Psychrobacter and related organisms." Int J Syst Bacteriol **41**: 310-319.

Sahm, D. F., M. E. Jones, et al. (2000). "Resistance surveillance of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated in Asia and Europe, 1997-1998." J Antimicrob Chemother **45**(4): 457-66.

Schalen, L., P. Christensen, et al. (1980). "High isolation rate of Branhamella catarrhalis from the nasopharynx in adults with acute laryngitis." Scand J Infect Dis **12**(4): 277-80.

Shurin, P. A., C. D. Marchant, et al. (1983). "Emergence of beta-lactamase-producing strains of Branhamella catarrhalis as important agents of acute otitis media." Pediatr Infect Dis **2**(1): 34-8.

Simpson, I. N. and S. J. Plested (1983). "The origin and properties of beta-lactamase satellite bands seen in isoelectric focusing." J Antimicrob Chemother **12**(2): 127-31.

Stobberingh, E. E., H. J. van Eck, et al. (1986). "Analysis of the relationship between ampicillin resistance and beta-lactamase production in Branhamella catarrhalis." Drugs **31 Suppl 3**: 23-7.

Stool, S. E. and M. J. Field (1989). "The impact of otitis media." Pediatr Infect Dis J **8**(1 Suppl): S11-4.

Thoene, D. E. and C. E. Johnson (1991). "Pharmacotherapy of otitis media." Pharmacotherapy **11**(3): 212-21.

Thornsberry, C., P. T. Ogilvie, et al. (1999). "Survey of susceptibilities of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2612-23.

Tinkelman, D. G. and H. J. Silk (1989). "Clinical and bacteriologic features of chronic sinusitis in children." Am J Dis Child **143**(8): 938-41.

Vaneechoutte, M., G. Verschraegen, et al. (1990). "Respiratory tract carrier rates of Moraxella (Branhamella) catarrhalis in adults and children and interpretation of the isolation of M. catarrhalis from sputum." J Clin Microbiol **28**(12): 2674-80.

Verduin, C. M., C. Hol, et al. (2002). "Moraxella catarrhalis: from emerging to established pathogen." Clin Microbiol Rev **15**(1): 125-44.

Verduin, C. M., M. Jansze, et al. (1994). "Differences in complement activation between complement-resistant and complement-sensitive Moraxella (Branhamella) catarrhalis strains occur at the level of membrane attack complex formation." Infect Immun **62**(2): 589-95.

Verduin, C. M., M. Kools-Sijmons, et al. (2000). "Complement-resistant Moraxella catarrhalis forms a genetically distinct lineage within the species." FEMS Microbiol Lett **184**(1): 1-8.

Veron, M., A. Lennoise-Furet, et al. (1993). "Relatedness of three species of "false neisseriae," Neisseria caviae, Neisseria cuniculi, and Neisseria ovis, by DNA-DNA hybridizations and fatty acid analysis." Int J Syst Bacteriol **43**(2): 210-20.

Wald, E. R., G. J. Milmoe, et al. (1981). "Acute maxillary sinusitis in children." N Engl J Med **304**(13): 749-54.

Walker, E. S., C. L. Neal, et al. (2000). "Long-term trends in susceptibility of Moraxella catarrhalis: a population analysis." J Antimicrob Chemother **45**(2): 175-82.

Wallace, M. R. and E. C. Oldfield, 3rd (1990). "Moraxella (Branhamella) catarrhalis bacteremia. A case report and literature review." Arch Intern Med **150**(6): 1332-4.

Wallace, R. J., Jr., D. R. Nash, et al. (1990). "Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*." *Am J Med* **88**(5A): 46S-50S.

Wallace, R. J., Jr., V. A. Steingrube, et al. (1989). "BRO beta-lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal beta-lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens*, and *M. lacunata*." *Antimicrob Agents Chemother* **33**(11): 1845-54.

Wardle, J. K. (1986). "*Branhamella catarrhalis* as an indirect pathogen." *Drugs* **31 Suppl 3**: 93-6.

Wilhelmus, K. R., J. Peacock, et al. (1980). "*Branhamella keratitis*." *Br J Ophthalmol* **64**(12): 892-5.

Wolf, B., M. Kools-Sijmons, et al. (2000). "Genetic diversity among strains of *Moraxella catarrhalis* cultured from the nasopharynx of young and healthy Brazilian, Angolan and Dutch children." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**(10): 759-64.

Wood, G. M., B. C. Johnson, et al. (1996). "*Moraxella catarrhalis*: pathogenic significance in respiratory tract infections treated by community practitioners." *Clin Infect Dis* **22**(4): 632-6.

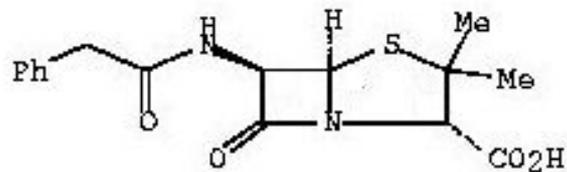
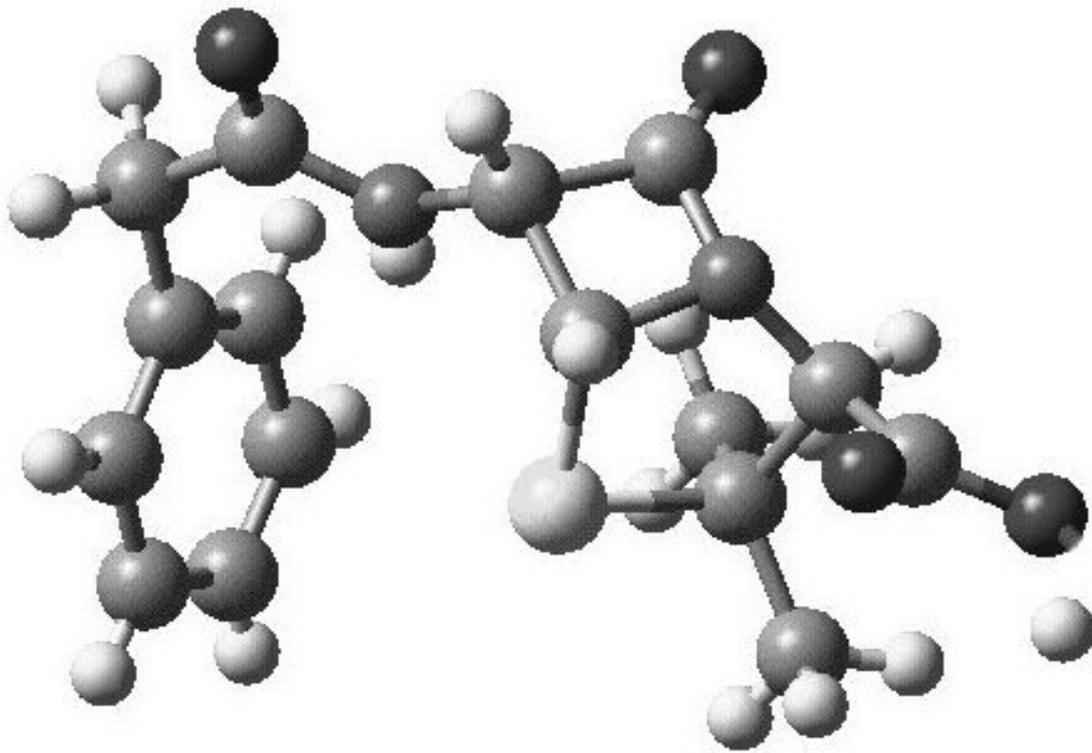
Wright, P. W., R. J. Wallace, Jr., et al. (1990). "A descriptive study of 42 cases of *Branhamella catarrhalis* pneumonia." *Am J Med* **88**(5A): 2S-8S.

Zaleski, A., N. K. Scheffler, et al. (2000). "Lipooligosaccharide P(k) (Galalpha1-4Galbeta1-4Glc) epitope of moraxella catarrhalis is a factor in resistance to bactericidal activity mediated by normal human serum." Infect Immun **68**(9): 5261-8.

Zhanel, G. G., J. A. Karlowky, et al. (2000). "Antibiotic resistance in respiratory tract isolates of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis collected from across Canada in 1997-1998." J Antimicrob Chemother **45**(5): 655-62.

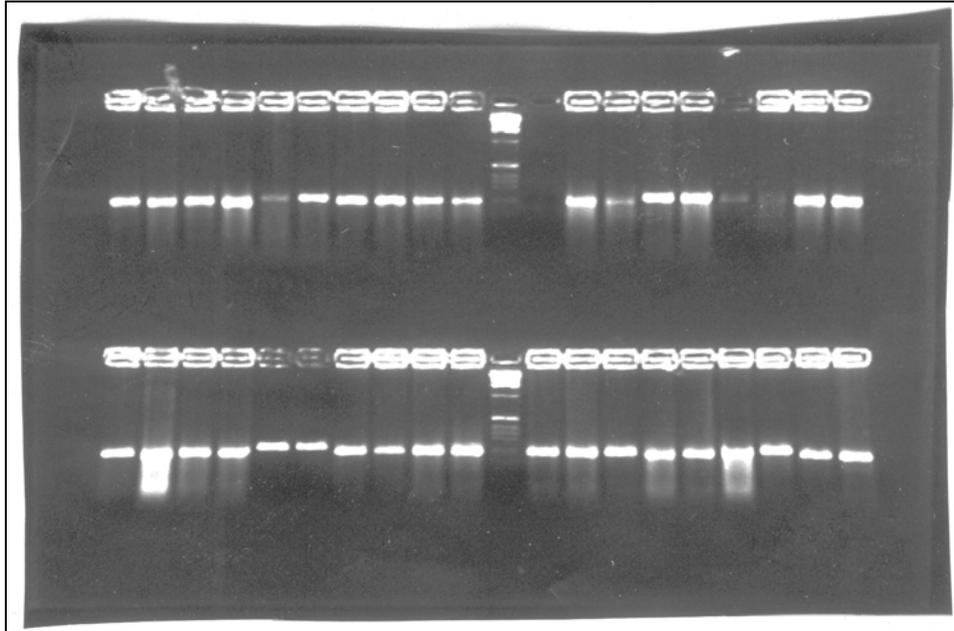
## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungen

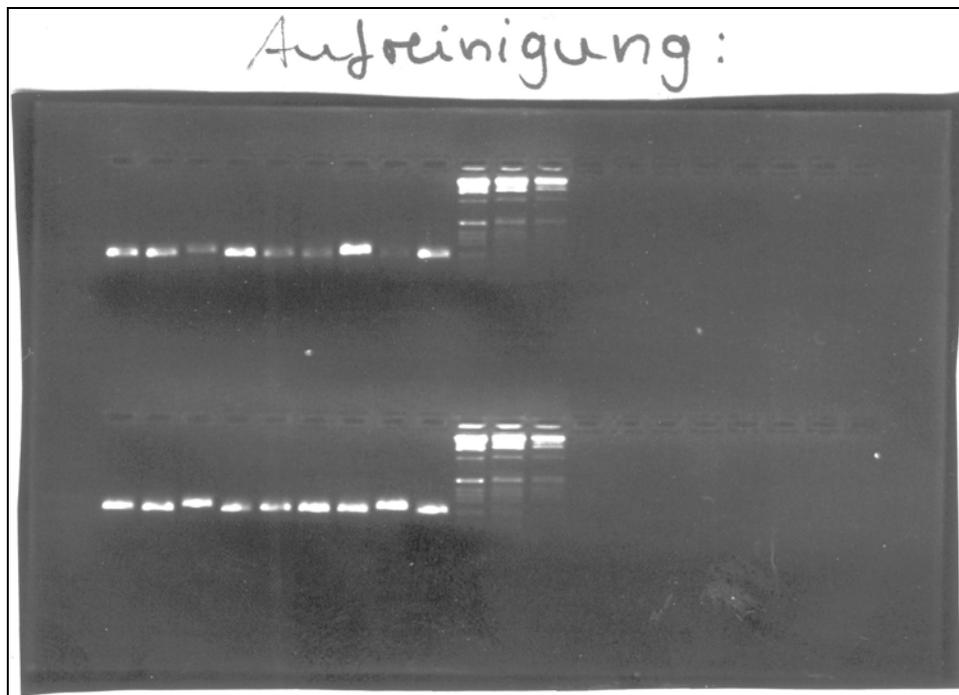


**Abbildung 1:** Strukturformel des Penicillin mit dem  $\beta$ -Laktamring (zentraler Viererring), der durch die BRO- $\beta$ -Laktamasen gespalten und inaktiviert wird (Bildnachweis:

[www.mbg.cornell.edu/biobm331/others/penicillin.htm](http://www.mbg.cornell.edu/biobm331/others/penicillin.htm))



**Abbildung 2:** Bandenmuster einer PCR nach elektrophoretischer Auftrennung, fotografiert unter UV-Fluoreszenz. Mittig erscheinen die Banden des Molekulargewichtsmarkers, an den Laufweiten kann bereits auf den bro-Typ der amplifizierten Sequenzen geschlossen werden.



**Abbildung 3:** Zugehöriges Gelbild der PCR nach der Aufreinigung. Die Anzahl der Proben hat sich halbiert. Es wurden drei Molekulargewichtsmarker unterschiedlicher Konzentration aufgetragen, die zur semiquantitativen Einschätzung der Menge an PCR-Produkt dienen. Der dunkle Schatten unterhalb der Banden entspricht dem Bluemarker.

**bro1-Gen**

1981 TGGTGAAGTGATTTTTGGATTGGGGTGAATGATAAACTTATCCCAAACAATAATAAATTT  
-35 -10

1741 ATCCCAAACAATAAAAAGGAGATAATGATGCAACGCCGTCATTTTTTACAAAAACCTTAT  
RBS Met M Q R R H F L Q K T L

1801 TGGCACTACCTATTATTTTTCTGGCAATTTATTAAGTGGATGTAAAACGAATTTATCTG  
L A L P I I F S G N L L T G C K T N L S

1861 ATGATTATTTGCCCGATGATAAGATAACAAACAATCCAAATTTATTACAAAATAAATTAA  
D D Y L P D D K I T N N P N L L Q N K L

1921 AAGAGATATTGCCAATTTGGGAAAATAAATTTAATGCCAAAATTGGTATGACGATTATTG  
K E I L P I W E N K F N A K I G M T I I

1981 CTGACAATGGTGAACCTATCCAGTCATCGTGGTAATGAATATTTTCCTGTTAATAGTACCA  
A D N G E L S S H R G N E Y F P V N S T

2041 TTAAAGCCTTTATTGCAAGTCATATATTACTTGTAGATAAAGAAAAATTGGATTTAA  
I K A F I A S H I L L L V D K E K L D L

2101 ACGAAAAAATCATCATTAAAGAAAGCGATTTGATAGAATATTCTCCTGTCTGTAAAAAAT  
N E K I I I K E S D L I E Y S P V C K K

2191 ACTTTGATGAGAATAAACCAATTTCTATTAGTGAATTGTGCGAAGCTACCATAACACTGA  
Y F D E N K P I S I S E L C E A T I T L

2221 GTGATAATGGTTCTGCTAATATCTTGTGGATAAAAATTGGGGTTTACTGCATTCAATC  
S D N G S A N I L L D K I G G L T A F N

2281 AATTTTTGAAAGAGATTGGGGCGGATATGGCGCTGGCAAATAATGAGCCTTTATTAAATC  
Q F L K E I G A D M A L A N N E P L L N

2341 GCTCACATTATGGTGA AACAGTGATACCGCAAACCAATTCCTTACACAAAAAGCCTAA  
R S H Y G E T S D T A K P I P Y T K S L

2401 AAGCACTGATTGTAGGCAATATCCTATCCAATCAAAGCAAAGAACAGTTGATAACTTGGC  
K A L I V G N I L S N Q S K E Q L I T W

2461 TTATCAATGATAAAGTTGCTGATAATTTATTGAGAAAATATTTACCAAAAAATTGGCGAA  
L I N D K V A D N L L R K Y L P K N W R

2521 TTGGCGACAAAACAGGCACAGGTAGTGAATCAAAAAATATCATTGCTGTGATTTGGAATG  
I G D K T G T G S E S K N I I A V I W N

2581 AAAATAATAAACCTTATTTTATCAGCCTATTTATCACCCAGCCCCATGATGGTAAATCCC  
E N N K P Y F I S L F I T Q P H D G K S

2641 TTGATTTTAAAAATCAAAAAGATGAAATAATGGCACAAATTGGTAAAGAAATTTATCCAT  
L D F K N Q K D E I M A Q I G K E I Y P

2701 TTTTAATAATCCATTAATTTTATAGTGAATAGAAAAATTTATGACCCAACAAGCCCCC  
F L S t o p

**Abbildung 4:** Nukleotidsequenz und resultierende Aminosäuresequenz von bro1. Kästchen markieren Start- und Stopcodon sowie die vermeintliche Lipidbindungsstelle

Upstream-Region des *bro*-Gens

	1551	1561	1571	1581	1591	1601	1611	1621	1631	1641
bro1	CCTGTGGGACAAGCAAACGGCTTACCTGTGGGCTTACAGCTCATCGGTAAACATTGGGCGGAAAGCGAGCTGTTAAAAACCGCTCACATTTACCAAAGCC									
bro2	.....G.....G.....A..G...T.G..T.....G.....A.....T.....T..GGCGA									
BRO2-Isolate:										
10B125	.....C..C..A..C.....A..G.....A.....G..C.....									
10B128	.....C.....C.....C.....T.....G..C.....									
10B130	.....C..A..C.C..C..C..A..C.....T.....G..C.....									
19B182	.....C.....AC.C..C..C..A..C.....T.....G..C.....									
20B065	.....									
18B112	.....A.....A.....■.■..C.T..■A...■.....G.....C.....C..AAGCC									
BRO1-Isolate										
02B005	.....C.....									
03C209	.....G.....									
09B004	.....TA.....G.....									
13B088	.....C.....									
13B108	.....A..G.....T..TA.....G.....									
14B053	.....T..C.....									
14B140	.....C.....									
14B141	.....C.....C.....A..G.....A..A..G..C.....									
14B162	.....C.....									
14B163	.....C.....									
14B167	.....A..G.....T..TA.....G.....									
17B034	.....A..G..T.G..T.....G.....									
20B048	.....T..TA.....G.....									

# Anhang

---

	1651	1661	1671	1681	1691	1701	1711	1721	1731	1741
bro1	ATACCGATTTTCATCAGGCAAAGGCGGATTTGGTGAAGTGATTTTTGGATTGGGGTGAATGATAAACTTATCCCAAACAATAATAAATTTATCCCAAACA									
bro2	.....G.....A.AG.T.....A..... <u>GAAC</u> .....A.A.....-----..... <u>.....</u> .....									
BRO2-Isolate:										
10B125	.....-----.....									
10B128	.....-----.....									
10B130	.....-----.....									
19B182	.....-----.....									
20B065	.....-----..... <u>T</u> .....									
18B112	.....T.....G.CA.T.....G.....TGGA.....G.G.....-----.....									
BRO1-Isolate										
02B005	.....									
03C209	.....									
09B004	.....									
13B088	.....									
13B108	.....									
14B053	.....									
14B140	.....									
14B141	.....									
14B162	.....									
14B163	.....									
14B167	.....									
17B034	.....									
20B048	.....									

```

1751      1761      1771      1781
bro1      ATAAAAGGAGATAATGATGCAACGCCGTCATTTTTTTACAA
bro2      .....G.....

BRO2-Isolate:
10B125    .....
10B128    .....
10B130    .....
19B182    .....
20B065    .GGG.....G.....

18B112    .....G.....

BRO1-Isolate
02B005    .....
03C209    .....
09B004    .....
13B088    .....
13B108    .....
14B053    .....
14B140    .....
14B141    .....
14B162    .....
14B163    .....
14B167    .....
17B034    .....
20B048    .....

```

**Abbildung 5:** Alignment von *bro1* und *bro2* sowie der Sequenz der mutierten BRO-2-Produzenten sowie von einigen mutierten BRO-1-Produzenten. Vermeintliche Promotorsequenzen (-10 und -35) und ribosomale Bindungsstelle von *bro1* und *bro2* sind unterstrichen. Ebenso die Mutationen, die lokal weder zur *bro1*- noch zur *bro2*-Sequenz führen. Die grauen Unterlegungen markieren die vier Positionen, an denen 18B112 die *bro2*-Sequenz behält.

## 7.2 Tabellen

**Tabelle 1:** Verteilung der  $\beta$ -Laktamase- bzw. BRO-1- und BRO-2-Aktivität. Das große Rechteck zeigt die Ergebnisse des Nitrocefin-Disk-Assay, das kleine Rechteck, die des PCR-Screenings. Wie in der Literatur üblich werden die Anteile der BRO-1- und BRO-2-Produzenten auf die Gesamtheit der  $\beta$ -Laktamase-positiven Isolate bezogen.

	Anzahl der Isolate		% aller Isolate
gesamt	419		100
$\beta$ -Laktamase-negativ	34		8,1
$\beta$ -Laktamase-positiv	385		100
	BRO-1	363	94
	BRO-2	22	5,7

**Tabelle 2:** Gegenüberstellung der MHK-Verteilungen von  $\beta$ -Laktamase-negativen Isolaten, BRO-1- und BRO-2-Produzenten für 29 Antibiotika.

Antibiotikum und Phänotyp/Genotyp	MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>	Bereich
<b>1. Penicillin</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	$\leq 0,03$	0,25	$\leq 0,03-0,5$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	4	>4	$\leq 0,03->4$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	1	>4	0,25->4
<b>2. Amoxicillin</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	$\leq 0,06$	0,25	$\leq 0,06-0,5$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	2	8	$\leq 0,06->8$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	8	$\leq 0,06->8$
<b>3. Amoxicillin-Clavulansäure</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	$\leq 0,25$	0,25	$\leq 0,25-0,5$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	0,25	0,25	$\leq 0,25-4$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	0,25	$\leq 0,25-0,5$
<b>4. Cefaclor</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	0,25	2	0,25-2
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	0,5	1	$\leq 0,25-2$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0,25-0,5
<b>5. Loracarbef</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	0,25	2	$\leq 0,25-2$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	1	2	$\leq 0,25-16$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	1	1	0,5-2
<b>6. Cefuroxim</b>			
$\beta$ -Laktamase-negativ	0,5	1	$\leq 0,06-2$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	1	2	$\leq 0,06-4$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	0,5	1	0,12-2

7. Cefprozil

β-Laktamase-negativ	0,5	4	0,12-4
β-Laktamase-positiv; BRO-1	2	4	≤0,12-16
β-Laktamase-positiv; BRO-2	2	4	0,5-4

8. Cefpodoxim

β-Laktamase-negativ	0,12	0,5	≤0,03-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,5	1	≤0,03-4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	0,5	0,06-1

9. Cefixim

β-Laktamase-negativ	≤0,03	0,03	≤0,03-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,12	0,25	≤0,03-2
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,06	0,5	≤0,03-0,5

10. Ceftibuten

β-Laktamase-negativ	0,12	1	≤0,03-4
β-Laktamase-positiv; BRO-1	1	4	≤0,03->4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	4	0,06-4

11. Cefotaxim

β-Laktamase-negativ	0,06	0,5	≤0,008-1
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,25	0,5	≤0,008-4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,06	0,5	0,03-1

12. Ceftazidim

β-Laktamase-negativ	0,25	0,25	≤0,25-2
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,25	0,25	≤0,25-8
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	0,25	≤0,25-2

13. Cefepim

β-Laktamase-negativ	0,12	0,5	≤0,06-2
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,5	2	≤0,06-4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,25	1	0,12-4

14. Faropenem			
β-Laktamase-negativ	0,03	0,25	0,03-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-1	0,12	1	0,03-1
β-Laktamase-positiv; BRO-2	0,03	0,25	0,03-0,5
15. Ciprofloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,0015	0,03	≤0,0015-0,25
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,0015	0,03	≤0,0015-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,0015	0,03	≤0,0015-0,06
16. Levofloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,5	≤0,5	≤0,5
17. Sparfloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,12	≤0,12	≤0,12-1
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,12	≤0,12	≤0,12-1
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,12	≤0,12	≤0,12
18. Gatifloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,25
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,03	≤0,03	≤0,03
19. Trovafloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,03	0,25	≤0,03-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,03	0,25	≤0,03-1
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,03	0,25	≤0,03-0,06
20. Grepafloxacin			
β-Laktamase-negativ	≤0,12	≤0,12	≤0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,12	≤0,12	≤0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,12	≤0,12	≤0,12

21. Moxifloxacin

β-Laktamase-negativ	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,12

22. Gemifloxacin

β-Laktamase-negativ	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,06
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,12
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,06

23. Erythromycin

β-Laktamase-negativ	≤0,25	≤0,25	≤0,25-4
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,25	≤0,25	≤0,25-4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,25	≤0,25	≤0,25-2

24. Azithromycin

β-Laktamase-negativ	≤0,12	≤0,12	≤0,12-4
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,12	≤0,12	≤0,12-16
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,12	≤0,12	≤0,12-1

25. Clarithromycin

β-Laktamase-negativ	≤0,25	≤0,25	≤0,25-4
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,25	≤0,25	≤0,25-4
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,25	≤0,25	≤0,25

26. Telithromycin

β-Laktamase-negativ	≤0,06	0,12	≤0,06-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤0,06	0,12	≤0,06-0,5
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤0,06	0,12	≤0,06-0,5

27. Tetracyclin

β-Laktamase-negativ	≤2	≤2	≤2
β-Laktamase-positiv; BRO-1	≤2	≤2	≤2
β-Laktamase-positiv; BRO-2	≤2	≤2	≤2

28. Rifampicin

$\beta$ -Laktamase-negativ	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$

29. Sulfamethoxazol/Trimethoprim

$\beta$ -Laktamase-negativ	$\leq 0,25$	0,25	$\leq 0,25 \rightarrow 8$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-1	$\leq 0,25$	0,25	$\leq 0,25 \rightarrow 8$
$\beta$ -Laktamase-positiv; BRO-2	$\leq 0,25$	0,25	$\leq 0,25 \rightarrow 8$

---

## Anhang

**Tabelle 3:** Verteilung der Komplement-Resistenz auf die der Gruppen der  $\beta$ -Laktamase-negativen Isolate, der BRO-1- und BRO-2-Produzenten. Das Layout orientiert sich an Tabelle 1.

	Komplement-sensibel		Komplement-resistent		
	abs	rel/%	abs	rel/%	
gesamt	80	100	339	100	
$\beta$ -Laktamase-negativ	5	6,3	29	8,6	
$\beta$ -Laktamase-positiv	75	100	310	100	
	BRO-1	70	93	293	95
	BRO-2	5	6,7	17	5,5

## Anhang

**Tabelle 4:** Zusammenstellung einiger Studien über die Prävalenz von  $\beta$ -Laktamase-positiven *M. catarrhalis*-Isolaten in Europa und Nordamerika sowie exemplarisch in Australien, Brasilien, Angola und Japan. <sup>1</sup>Jahr der Veröffentlichung. <sup>2</sup>Anteil der BRO-1-Produzenten betrug 93,1%, ein Isolat konnte nicht zugeordnet werden. <sup>3</sup>In Klammern Anzahl der Isolate die per IEF auf BRO-1- bzw. BRO-2-Produktion untersucht wurden. <sup>4</sup>Isolate wurden nach  $\beta$ -Laktamase-Aktivität ausgewählt

Autoren	Zeitraum	Herkunft	Anzahl	Laktamase-Prävalenz	Anteil BRO-2
(Kallings, Bengtsson et al. 1983)	1983	Schweden	226	35%	
(Davies and Maesen 1988)	1980	Süd-Niederlande	249	7%	
	1981		303	38%	
	1982		318	22%	
	1983		378	44%	
	1984		281	51%	
	1985		312	70%	
	1986		446	63%	
(Christensen, Keiding et al. 1990)	1983/84	Dänemark	50	25%	6,6%
	1988		30 (30) <sup>3</sup>	63%	
(Ahmad, McLeod et al. 1984)	(1984 <sup>1</sup> )	Schottland	54	65%	
(Chaibi, Mugnier et al. 1995)	1989-93	Frankreich (Paris)	62 (50) <sup>3</sup>	82%	6%
(Ejlertsen and Skov 1996)	6/89- 5/90	Dänemark	70	84%	5,1% <sup>2</sup>

## Anhang

(Fung, Yeo et al. 1994)	1991	England/Schottland	413	90,8%	6,9%
(Berk and Kalbfleisch 1996)	1993	Deutschland, Frankreich Großbritannien, Italien, Spanien,	376	81,6%	
(Felmingham, Robbins et al. 1996)	1994/95	Großbritannien	200	85%	
(Sahm, Jones et al. 2000)	1997/98	Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Italien, Spanien	556	87,4%	
(Jones, Staples et al. 2000)	3-6/98	Deutschland, Frankreich, Italien, Österreich, Schweiz	226	90,3%	
(Nash, Wallace et al. 1986)	1982/83	USA	172	72%	8%
(Jorgensen, Doern et al. 1990)	1987/88	USA	378	84,1%	
(Barry, Pfaller et al. 1994)	1992/93	USA	698	92%	
(Berk and Kalbfleisch 1996)	1993	USA	148	93,8%	
(Richter, Winokur et al. 2000)	1994/95	USA	606	95%	
	1997/98		513	93,2%	
(Thornsberry, Ogilvie et al. 1999)	1996/97	USA	444	93,7%	
(Doern, Jones et al. 1999)	1997	USA/Canada	503	92,2%	
(Zhanel, Karlowsky et al. 2000)	1997/98	Canada	428	94,2%	
(Jones and Pfaller 2000)	1999	USA	539	93,9%	

## Anhang

(Wood, Johnson et al. 1996)	(1996) <sup>1</sup>	Australien	212	92%	
(Wolf, Kools-Sijmons et al. 2000)	1996	Brasilien	30	97%	
		Angola	19	89%	
(Sahm, Jones et al. 2000)	1997/98	Japan	82	97,6%	
(Ikeda, Yokota et al. 1993)	1984-90	Japan	68	- <sup>4</sup>	9%

## Anhang

**Tabelle 5:** *Verteilung der MHK-Werte von BRO-1- und BRO-2-Produzenten für Penicillin.*

Penicillin MHK	Anzahl BRO-1	Anteil	Anzahl BRO-2	Anteil
<=0,03	23	6,4%		
0,06	5	1,4%		
0,12	4	1,1%		
0,25	11	3,0%	5	22,7%
0,5	40	11,0%	4	18,2%
1	32	8,8%	2	9,1%
2	35	9,7%	4	18,2%
4	57	15,7%	3	13,6%
>4	155	42,8%	4	18,2%

**Tabelle 6:** *Verteilung der der MHK-Werte von BRO-1- und BRO-2-Produzenten für Amoxicillin.*

Amoxicillin MHK	Anzahl BRO-1	Anteil	Anzahl BRO-2	Anteil
<=0,06	35	9,7%	3	13,6%
0,12	38	10,5%	4	18,2%
0,25	23	6,4%	4	18,2%
0,5	28	7,7%		
1	47	13,0%	4	18,2%
2	92	25,4%	3	13,6%
4	55	15,2%		
8	35	9,7%	3	13,6%
>8	9	2,5%	1	4,5%

## Anhang

**Tabelle 7:** *Verteilung der der MHK-Werte von BRO-1- und BRO-2-Produzenten für die Kombination Amoxicillin und Clavulansäure.*

Amox/Clav MHK	Anzahl BRO-1	Anteil	Anzahl BRO-2	Anteil
<=0,25	348	96,1	21	95,5
0,5	9	2,5	1	4,5
1	4	1,1		
2	0	0,0		
4	1	0,3		
8				
>8				

## Anhang

**Tabelle 8:** Übersicht über die MHK-Werte von einigen BRO-1-Produzenten, die Mutationen aufwiesen, und allen BRO-2-Produzenten für Penicillin, Amoxicillin und die Kombination Amoxicillin/Clavulansäure. Fettgedruckt sind alle Isolate mit Mutationen in der upstream-Region des bro-Gens.

Isolat	MHK-Werte für			
	BRO-1-Produzenten	Penicillin	Amoxicillin	Amox/Clav
<b>20B048</b>		0.25	<=0.06	<=0.06
<b>14B053</b>		0.25	0.12	<=0.06
<b>09B004</b>		0.25	1	0.25
<b>14B140</b>		0.5	0.12	<=0.25
<b>14B162</b>		0.5	0.12	<=0.25
<b>02B005</b>		0.5	0.12	<=0.06
<b>14B141</b>		1	0.5	<=0.25
<b>13B108</b>		2	1	<=0.25
<b>13B088</b>		4	2	0.5
<b>14B163</b>		4	4	<=0.25
<b>03C209</b>		> 4	2	<=0.25
<b>14B167</b>		> 4	4	<=0.25
<b>17B034</b>		> 16	8	0.25
BRO-2-Produzenten				
18B078		0.25	<=0.06	<=0.06
06B023		0.25	<=0.06	<=0.06
20B077		0.25	<=0.06	<=0.06
<b>10B130</b>		0.25	0.12	<=0.25
<b>10B128</b>		0.25	0.25	<=0.25
18B116		0.5	0.12	<=0.25
10B024		0.5	0.12	<=0.06
<b>18B112</b>		0.5	0.25	<=0.25
09B071		0.5	0.25	<=0.25
10B020		1	0.12	0.06
20B085		1	0.25	<=0.06
02B142		2	1	<=0.25
02B143		2	1	<=0.25
07B081		2	1	<=0.25
<b>20B065</b>		2	2	0.12
<b>19B182</b>		4	1	<=0.25
<b>10B125</b>		4	2	<=0.25
20B070		4	8	0.5
18B113		> 4	2	<=0.25
13B110		> 4	8	<=0.25
13B104		> 4	8	<=0.25
17B024		8	>8	0.12

**Tabelle 9:** Vom NCCLS ausgezeichnete Schwellengrenzen für MHK-Bestimmungen bei anspruchslosen Keimen mit schnellem Wachstum in Müller-Hinton-Medium.

Antibiotikum	MHK-Breakpoints (µg/ml)		
	S	I	R
1. Penicillin	≤8	-	≥16
2. Amoxicillin	≤8	-	≥16
3. Amoxicillin-Clavulansäure	≤8	-	≥16
4. Cefaclor	≤8	16	≥32
5. Loracarbef	-	-	-
6. Cefuroxim	≤4	8-16	≥32
7. Cefprozil	≤8	16	≥32
8. Cefpodoxim	≤2	4	≥8
9. Cefixim	≤1	2	≥4
10. Ceftibuten	-	-	-
11. Cefotaxim	≤8	16-32	≥64
12. Ceftazidim	≤8	16	≥32
13. Cefepim	≤8	16	≥32
14. Faropenem	-	-	-
15. Ciprofloxacin	≤1	2	≥4
16. Levofloxacin	≤1	2	≥4
17. Sparfloxacin	≤1	2	≥4
18. Gatifloxacin	≤1	2	≥4
19. Trovafloxacin	≤1	2	≥4
20. Grepafloxacin	-	-	-
21. Moxifloxacin	-	-	-
22. Gemifloxacin	-	-	-
23. Erythromycin	≤0,5	1-4	≥8
24. Azithromycin	≤2	4	≥8
25. Clarithromycin	≤2	4	≥8
26. Telithromycin	-	-	-
27. Tetracyclin	≤4	8	≥16
28. Rifampicin	≤1	2	≥4
29. Sulfamethoxazol/Trimethoprim	≤2	4	≥8

## **Danksagung**

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz Ph. D. für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine freundliche Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit und Frau Prof. Dr. med. Helga Idel für die Übernahme der Korreferentschaft.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Mikrobiologie und der Virologie, den medizinisch-technischen Assistenten, Diplomanden und Doktoranden, Mechthild Boos, Susanne Mayer sowie insbesondere den Mitarbeitern der Nährbodenküche für die tatkräftige Unterstützung und nette Atmosphäre. Ich bedanke mich bei Marzena Czarna für die ständige Ansprechbarkeit, Hilfsbereitschaft und liebenswürdige Art.

Herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter des BMFZ. Vielen Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Karl Köhrer und Frau Dr. rer. nat. Sybille Scheuring für die fachliche Beratung, stete Hilfsbereitschaft und Ausdauer.

Zu guter letzt gilt mein Dank Mirell Perdikouli, ohne die die Arbeit nicht das gewesen wäre, was sie war.

## ANDREAS BEECK

Obenitterstr. 47  
42719 Solingen  
Tel: 0212 / 31 57 80:  
Mobil: 0179 / 58 68 189  
andreasbeeck@hotmail.com

Geburtsdatum: 04.02.1972  
Geburtsort: Wuppertal  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

---

### AUSBILDUNG

---

11/02	<b>Drittes Staatsexamen</b>
09/01	<b>Zweites Staatsexamen</b>
03/99	<b>Erstes Staatsexamen</b>
03/98	<b>Ärztliche Vorprüfung</b>
Seit 04/96	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
11/95	<b>Diplom-Vorprüfung Physik</b>
10/92 - 11/95	Studium der Physik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
06/91	<b>Abitur</b> am Humboldt-Gymnasium in Solingen, Schwerpunkte Mathematik, Physik, Deutsch und Geschichte.

---

### BERUFSERFAHRUNG, PRAKTIKA

---

#### PRAKTISCHES JAHR

06/02 - 09/02	<b>Chirurgie</b> , Regionalspital Thun, Schweiz.
02/02 - 06/02	<b>Radiologie</b> , Städtische Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim.
10/01 - 02/02	<b>Innere Medizin</b> , Städtische Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim.

#### FAMULATUREN

08/00 - 09/00	<b>Innere Medizin, Pneumologie</b> , St. Luke's Hospital Guardamangia, Malta.
02/00 - 03/00	<b>Innere Medizin, Gastroenterologie</b> , Evangelisches Krankenhaus, Universität Düsseldorf.
08/99	<b>Innere und Praktische Medizin</b> , Dr. med. H. D. Curdes, Mönchengladbach
07/99	Institut für <b>Mikrobiologie</b> , Universität Düsseldorf

#### ZIVILDienst

08/91 - 09/92	<b>Pflegedienst</b> , Innere Medizin, Nephrologie, Städt. Klinikum Solingen
---------------	---

#### ERGÄNZENDE AKTIVITÄTEN

98 - 01	<b>Studentische Hilfskraft in der Datenverarbeitung</b> im C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung, Universität Düsseldorf.
98 - 01	<b>Tutor für präklinische Kurse der Lungen-, Herz- u. Kreislauf-Physiologie</b> , Institut für Herz- und Kreislauf Physiologie, Universität Düsseldorf.
97 - 99	<b>Pflegehelfer</b> auf Stationen der Chirurgie und Gynäkologie, Uni-Klinik Düsseldorf.
97 - 98	Teilnahme an Kursen für <b>Sonographie-Diagnostik</b> und <b>CT-Diagnostik</b> , Universität Düsseldorf.
92 - 98	<b>Pflegehelfer</b> auf Stationen der Inneren Medizin und der Urologie, Städt. Klinikum Solingen.

---

## **WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT**

---

### **PROMOTION**

99 - 2001

Experimentelle Forschungsarbeit:

#### **Produktion von BRO-beta-Laktamasen und Komplement-Resistenz europäischer Moraxella catarrhalis Isolate**

unter der Leitung von PRIV.-DOZ. DR. MED. FRANZ-JOSEF SCHMITZ PH. D., Institut für Mikrobiologie, Universität Düsseldorf.

### **VERÖFFENTLICHUNGEN**

04/02

SCHMITZ FJ, BEECK A, PERDIKOULI M, BOOS M, MAYER S, SCHEURING S, KÖHRER K, VERHOEF J, FLUIT AC.

#### **Production of BRO beta-Lactamases and Resistance to Complement in European Moraxella catarrhalis Isolates.**

J Clin Microbiol. 2002 Apr;40(4):1546-8.

12/01

SCHMITZ FJ, PERDIKOULI M, BEECK A, VERHOEF J, FLUIT AC.

#### **Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and modifications in genes coding for dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in European Streptococcus pneumoniae isolates.**

J Antimicrob Chemother. 2001 Dec;48(6):935-6. No abstract available.

09/01

SCHMITZ FJ, PERDIKOULI M, BEECK A, VERHOEF J, FLUIT AC.

#### **Molecular surveillance of macrolide, tetracycline and quinolone resistance mechanisms in 1191 clinical European Streptococcus pneumoniae isolates.**

Int J Antimicrob Agents. 2001 Nov;18(5):433-6.

01/01

SCHMITZ FJ, FLUIT AC, BEECK A, PERDIKOULI M, VON EIFF C.

#### **Development of chromosomally encoded resistance mutations in small-colony variants of Staphylococcus aureus.**

J Antimicrob Chemother. 2001 Jan;47(1):113-5.

09/00

SCHMITZ FJ, FLUIT AC, HAFNER D, BEECK A, PERDIKOULI M, BOOS M, SCHEURING S, VERHOEF J, KÖHRER K, VON EIFF C.

#### **Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus isolates.**

Antimicrob Agents Chemother. 2000 Nov;44(11):3229-31.

## **KENNTNISSE UND INTERESSEN**

---

### **SPRACHEN**

Englisch, Französisch, Spanisch

### **EDV**

Windows, Word, Excel, Internet

### **HOBBS**

Musik (Gitarre), Fußball, Jogging

---