

Diagnostische DNA-Microarrays zum Nachweis von
 β -Lactam-Resistenzen in der klinischen Mikrobiologie
mittels Genotypisierung bakterieller Resistenzgene

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Dirk Michael Leinberger
aus Tettngang

Tag der mündlichen Prüfung: 31. August 2009
Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: PD Dr. Till T. Bachmann

Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart

2009

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, April 2009

Dirk M. Leinberger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	4
Summary	5
Background	5
Integrated Detection of TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases	7
Detection of AmpC- and OXA beta-lactamases	13
Conclusion and outlook	15
1. Einleitung	16
1.1. β -Lactam-Resistenz – Hintergrund.....	16
1.1.1 β -Lactam-Antibiotika und ihre Wirkungsweise.....	16
1.1.2 Resistenzmechanismen.....	17
1.1.3 Einteilung der β -Lactamasen	19
1.2. β -Lactamasen mit erweitertem Substratspektrum	20
1.2.1 TEM und SHV β -Lactamasen	21
1.2.2 CTX-M β -Lactamasen.....	22
1.2.3 Seltene ESBLs	22
1.2.4 Epidemiologie	23
1.3. AmpC- β -Lactamasen.....	25
1.3.1 Chromosomal codierte AmpC- β -Lactamasen.....	25
1.3.2 Plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen	26
1.4. Oxacillinasen (OXA)	27
1.4.1 OXA-Enzyme mit erweitertem Substratspektrum	28
1.4.2 OXA-Carbapenemasen	28
1.5. Diagnostische Methoden	29
1.5.1 Phänotypischer ESBL-Nachweis	29
1.5.2 Genotypischer ESBL-Nachweis.....	32
1.6. DNA-Microarrays	35
1.7. Zielstellung dieser Arbeit	38
2. Material und Methoden	39
2.1. Materialien	39
2.1.1 Geräte.....	39
2.1.2 Chemikalien	39
2.1.3 Bioreagenzien und Kits.....	40
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.5 Puffer und Lösungen	40
2.1.6 Software.....	41
2.1.7 Stämme und Isolate.....	41
2.1.7.1. Referenzstämme.....	41
2.1.7.2. Klinische Isolate	42
2.2. Methoden.....	44
2.2.1 Sequenzanalyse	44
2.2.2 Sondendesign.....	44
2.2.2.1. Standard-Sondendesign	44
2.2.2.2. Alternatives Sondendesign	45
2.2.2.3. Kontrollen.....	45
2.2.3 Herstellung der Oligonukleotid-Microarrays.....	46

2.2.4	Stämme, Isolate und Empfindlichkeitstestungen	47
2.2.4.1.	Referenzstämme.....	47
2.2.4.2.	Klinische Isolate	47
2.2.4.3.	Empfindlichkeitstestungen	47
2.2.5	Herstellung der Ziel-DNA.....	48
2.2.5.1.	Amplifizierung und Markierung	48
2.2.5.2.	Aufreinigung, Konzentrationsbestimmung und Einbaurate.....	50
2.2.6	Prozessierung der Ziel-DNA	51
2.2.7	Hybridisierung.....	51
2.2.8	Quantifizierung.....	52
2.2.9	Datenverarbeitung	52
2.2.10	DNA-Sequenzierung.....	54
3.	Ergebnisse	56
3.1.	ESBL-Microarray – TEM-, SHV- und CTX-M-β-Lactamasen	56
3.1.1	PCR-Etablierung.....	57
3.1.1.1.	Amplifizierung von <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} und <i>bla</i> _{CTX-M}	57
3.1.1.2.	CTX-M Primer-Redesign.....	60
3.1.1.3.	Alternative Amplifikationsstrategie	62
3.1.2	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	65
3.1.2.1.	Hybridisierungslösung und Hybridisierungstemperatur	65
3.1.2.2.	Einfluss von SDS auf die Hybridisierung	69
3.1.3	Integration der TEM- SHV- und CTX-M Chipmodule.....	71
3.1.3.1.	Machbarkeitsnachweis.....	71
3.1.3.2.	Integration und Umstellung des Herstellungsprozesses.....	74
3.1.4	Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule	77
3.1.4.1.	Erweiterungen der TEM- und SHV-Chipmodule	77
3.1.4.2.	Sonden-Redesign I	91
3.1.4.3.	Sonden-Redesign II	93
3.1.5	Validierung mit klinischen Isolaten.....	99
3.1.5.1.	Herstellung der Ziel-DNA/PCR Screening	100
3.1.5.2.	Layout und Abdeckung	103
3.1.5.3.	Hybridisierung und Identifikation.....	103
3.1.5.4.	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	108
3.1.5.5.	Leistungsfähigkeit der SONDENSÄTZE	109
3.1.5.6.	Mischungen.....	113
3.1.5.7.	Kreuzhybridisierungen	115
3.2.	AmpC-Chipmodul	119
3.2.1	Sondendesign und Layout.....	119
3.2.2	Etablierung des Systems.....	120
3.2.3	Analyse der SONDENSÄTZE.....	129
3.3.	OXA-Chipmodul.....	131
3.3.1	Validierung mit klinischen Isolaten.....	132
3.3.2	Analyse der SONDENSÄTZE.....	138
4.	Diskussion	140
4.1.	Genotypischer Nachweis von Resistenz	140
4.2.	DNA-Microarrays zur Resistenztestung.....	143
4.3.	ESBL-Microarray	145
4.3.1	Produktion der Ziel-DNA.....	145
4.3.2	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	147
4.3.3	Sondendesign und Redesign.....	148
4.3.4	Aktualisierung und Abdeckung	150
4.3.5	Integration und Qualität der Microarray-Herstellung.....	151

4.3.6	Validierung mit klinischen Isolaten.....	152
4.3.7	Leistungsmerkmale des Assays	155
4.4.	AmpC-Chipmodul	158
4.5.	OXA-Chipmodul.....	160
4.6.	Fazit und Ausblick	162
5.	Literaturverzeichnis	163
6.	Anhang	185
6.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	185
6.2.	Sondensequenzen.....	187
6.2.1	TEM, SHV und CTX-M Dreifach-Chip	187
6.2.2	AmpC-Chipmodul	190
6.2.3	OXA-Chipmodul.....	191
6.3.	Chip-Layouts	193
6.4.	Empfindlichkeitstestungen der klinischen Isolate	195
6.5.	Sequenzen der detektierten <i>bla</i> -Gene.....	199
6.6.	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit.....	200
6.6.1	Publikationen	200
6.6.2	Konferenzbeiträge:	200
6.7.	Danksagung	201
6.8.	Lebenslauf	203

Zusammenfassung

Eine der größten Resistenzproblematiken in der Humanmedizin ist die Unempfindlichkeit gramnegativer Infektionserreger, wie z. B. *E. coli* oder *K. pneumoniae*, gegenüber modernen β -Lactam-Antibiotika. Diese wird hauptsächlich durch die Produktion plasmidkodierter β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) vermittelt. Als ESBLs wurden zunächst Varianten der TEM- und SHV-Enzyme bezeichnet, die aufgrund von Mutationen und den daraus folgenden Aminosäure-Substitutionen ein erweitertes Substratspektrum besitzen. Zusätzliche Varianten sind resistent gegenüber β -Lactam-Inhibitoren (IRT) oder werden als komplexe Varianten (CMT) bezeichnet. Inzwischen besitzt die CTX-M-Enzymfamilie große klinische Relevanz und ist in Europa vorherrschend. Von wachsender Bedeutung sind ebenfalls plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen und einige β -Lactamasen der Ambler Klasse D (OXA). Infektionserreger, die diese Enzyme produzieren, werden immer häufiger registriert und verursachen eine Vielzahl von Problemen bei der Therapie, Infektionskontrolle und Krankenhaushygiene. Die ESBL-Detektion ist zu einer klinischen Herausforderung geworden und klassische phänotypische Methoden werden den Anforderungen in diesem Bereich oft nicht gerecht. Ursächlich hierfür sind vor allem die heterogenen Substrataffinitäten der verschiedenen Enzyme. Die meist notwendigen Bestätigungstests verzögern das Testresultat und machen eine prospektive Therapie unmöglich. Da eine falsche empirische Therapie zu einem erhöhten Selektionsdruck, höheren Mortalitätsraten und Kosten führt, ist eine schnelle und eindeutige Information hinsichtlich der Resistenz eines Erregers essentiell. Molekulare Methoden haben ein großes Potential zur Beschleunigung der Erregerdiagnostik. Mit Hilfe der Microarray-Technologie können verschiedene Resistenzgene in weniger als einem Tag nachgewiesen und bis zur Identifikation der allelischen Variante genotypisiert werden. Anschließend können alle Informationen, die über das codierte Enzym zur Verfügung stehen, einschließlich des Substratspektrums, für die Therapieentscheidung und epidemiologische Fragestellungen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde ein integrierter diagnostischer DNA-Microarray für den schnellen Nachweis und die Genotypisierung der in gramnegativen Bakterien häufigsten ESBL-assoziierten Resistenzgenfamilien, bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M} , entwickelt und validiert. Der Microarray umfasst 618 spezifische Sonden, die in 2172 Spots angeordnet sind und zur Identifizierung von Mutationen dienen, die für 156 unterschiedliche Aminosäureaustausche verantwortlich sind. Daraus resultiert eine bisher unerreichte hohe Abdeckung bekannter TEM-, SHV- und CTX-M-Varianten. Nach umfangreichen Optimierungen in den Bereichen Sondendesign, Hybridisierungsbedingungen und der Etablierung einer effizienten Amplifikationsstrategie für die drei bla -Gene wurde der Chip mit 60 verblindeten klinischen Isolaten getestet, von denen 58 phänotypisch als ESBL-positiv charakterisiert wurden. Der Microarray-basierte Assay konnte die Genotypen der Isolate mit einer hervorragenden Diskriminierung und Reproduzierbarkeit auflösen, zeigte eine gute Genotyp-Phänotyp-Korrelation und eine robuste Identifikation von Mischungen von Varianten der gleichen Genfamilie. Die Daten der Studie wurden mittels Sequenzierung bestätigt. Die ESBL-Phänotypen konnten auf ESBL-Varianten von bla_{CTX-M} (76 %), bla_{SHV} (22 %) oder beiden (2 %) zurückgeführt werden. ESBL-Varianten von bla_{TEM} wurden nicht nachgewiesen. Zwei Isolate, die aus unterschiedlichem Probenmaterial desselben Patienten stammten, enthielten jeweils zwei ESBL-Varianten von bla_{CTX-M} (CTX-M-15 und CTX-M-14b). Die am häufigsten identifizierten ESBLs waren CTX-M-15 (57 %) und SHV-12 (18 %). Aufgrund einer Dauer von 4,5 h und der hohen Abdeckung ESBL-assoziiierter Gene und Genvarianten, könnte der hier entwickelte Assay eine interessante Option für den Resistenznachweis in der klinischen Mikrobiologie und die Überwachung der Verbreitung dieser Resistenzgene darstellen. Für die spätere Erweiterung des ESBL-Chips wurde ein Microarray für den Nachweis und die Identifikation von plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen entwickelt und erfolgreich mit Vertretern der *C. freundii*-Gruppe plasmidkodierter AmpCs getestet. Des Weiteren wurde die Validierung eines zuvor entwickelten OXA-Chips erfolgreich abgeschlossen. Diese Chips werden in Zukunft den klinischen Nutzen des Verfahrens noch einmal deutlich erhöhen.

Summary

Background

One of the major threats in human healthcare is the resistance of widespread pathogens, such as *E. coli*, *Klebsiella spp.* or other *Enterobacteriaceae*, against broadspectrum beta-lactam antibiotics. Predominantly, these resistances are conferred by the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) which have become a concern in medical bacteriology regarding both, antimicrobial treatment and infection control in hospitals. Initially, resistance against beta-lactam antimicrobials including oxyimino-cephalosporins (e.g., cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime) was mainly caused by the spread of TEM and SHV type ESBLs, which evolved via mutation from the classic TEM-1, TEM-2 and SHV-1 enzymes. Plasmid-mediated derivatives with an extended substrate spectrum determined by specific point mutations altering the enzymes' substrate spectrum have been known since the early 1980s. Additionally, other mutational events that affect substrate affinity for beta-lactamase inhibitors, such as clavulanic acid, lead to inhibitor resistant (IRT) or complex mutant type (CMT) enzymes which confer inhibitor resistance and resistance to extended-spectrum cephalosporins. During the last ten years, other ESBLs have gained increased importance, especially the CTX-M enzymes, which now have become most prevalent in Europe and other parts of the world. The *bla*_{CTX-M} genes probably emerged through several mobilization events of their natural homologues in the genus *Klyvera* and have undergone evolution since that time. They have intrinsic ESBL activity and are clustered in five subgroups. These groups are designated as: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, and CTX-M25. In addition, apart from the Ambler class A TEM, SHV and CTX-M type ESBLs, several beta-lactamases of the classes C (AmpC) and D (OXA) have emerged in clinics. Severe resistance against cephalosporins including cephamycins are conferred by plasmid mediated AmpC beta lactamases, which are mainly found in nosocomial isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. They are derived from chromosomal *ampC* genes of several members of the family *Enterobacteriaceae* and are clustered in six main groups according to their chromosomal origin: *Citrobacter freundii* (CIT), *Hafnia alvei* (ACC), *Aeromonas sobria* (FOX), *Enterobacter* (ENT), *Morganella morganii* (DHA) und *Aeromonas* (AER). Another growing family of ESBLs is the very heterogeneous group of OXA-type beta lactamases lactamases, which have been found mainly in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. A specific OXA subgroup is even capable of hydrolyzing carbapenems (Group V, subgroup 3).

Different surveillance studies have shown an increased prevalence of ESBL-producing isolates in Europe and other geographical areas. Antibiotic resistances associated with the production of ESBLs and other critical beta lactamases (AmpC or extended spectrum OXA enzymes) leave only a few treatment choices, such as carbapenems. Thus, fast and accurate information about resistance of the aetiologic pathogen is decisive for the initiation of the appropriate antimicrobial therapy to avoid therapy failures and promote a positive outcome for the patient. Recent reports have described several adverse clinical and economic outcomes associated with ESBL production, including higher overall and infection-related mortality, increased length of stay, delay of appropriate therapy, discharge to chronic care and higher costs. Additionally, the identification of ESBL-producing isolates has a great influence on hospital infection control measures, e.g. isolation of patients to avoid the further spread of ESBLs.

ESBL detection has become a clinical challenge and unfortunately, despite considerable efforts at improvement, routine culture-based phenotypic ESBL tests are not always able to detect an ESBL. This is mainly due to the variable activity against potential substrates of the different enzymes (or enzyme variants) and the confounding factors that modify their expression (e.g., the "inoculum effect"). Necessary confirmation tests delay the test results and prevent a prospective therapy. As most confirmatory tests are based on the synergy

effect between the antibiotics tested and β -lactamase inhibitors, coexistence of the ESBL with other beta-lactamases, e. g. IRTs or plasmid-encoded cephalosporinases (AmpC) can lead to misinterpreted results. Therefore the phenotypic identification of ESBL associated resistance and the differentiation of this mechanism from other mechanisms leading to broad spectrum beta lactam resistance is sometimes difficult in practice, laborious and slow. Furthermore, phenotype-based resistance tests fail to identify which gene variant is generating the resistance and if it is a single isolated case or the result of a pandemic spread.

Molecular detection of genes conferring resistance and in particular of those encoding for beta-lactamases offers a great potential to improve antimicrobial therapy and benefit for essential epidemiological studies on antimicrobial resistance. Genotyping is entirely independent of the degree of gene expression and independent of substrate affinity by the strains involved. The unambiguous identification of particular beta-lactamase genes in a clinical isolate could provide clinicians with important information regarding the resistance pattern of the etiological agent and consequently guide the antibiotic therapy as well as infection control measures. Apart from standard PCR and gene sequencing, several competing techniques for a fast identification have been developed during the past few years with a few of them having the ability to discriminate between a limited number of variants, e. g. PCR-RFLP, PCR-SSCP, Real-time or Pyrosequencing. However, all these techniques have an inherently limited multiplexing capacity and the genotyping of TEM, SHV or CTX-M beta-lactamases with altogether more than 300 known variants (<http://www.lahey.org/studies/>) would be technically overflowing, very costly, time demanding and tedious. These assays may be combined with sequencing techniques, however, time and cost factors obviate a routine usage even if large scale sequencing techniques would become increasingly available for research. DNA microarrays on the other hand seem to be an ideal genotyping platform, which is capable of analyzing a large amount of genetic information in a single experiment within reasonable time frames and costs. Microarrays targeting the detection of resistance determinants have been described with focus on certain species, bacterial families or resistance mechanisms. However, most studies seemed to be of limited clinical utility as they included the detection of beta-lactamase genes only on a family level and did not cover point mutations necessary for identification of substrate patterns and therapy recommendation.

To fill this gap, the main objectives of this study were the development and validation of an integrated diagnostic DNA microarray for the rapid identification of ESBLs by genotyping the three most prevalent ESBL-associated resistance genes in gram negative Bacteria, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}. To further increase the coverage of this microarray for other relevant lactamases and therefore its clinical value, a new chip module for plasmid-mediated AmpCs beta lactamases was developed and the validation of a previously developed array for the genotyping of different groups of OXA beta lactamases was completed.

Integrated Detection of TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases

The development of the described chip included the integration of chip prototypes for different beta-lactamase genes, which were previously designed within the BMBF funded GenoMik research project (*Genome research on microorganisms*) at the Institute for Technical Biochemistry (ITB), University of Stuttgart, in Stuttgart, Germany, as well as the integration of newly designed and redesigned probe sets. During the technical integration of the different chip modules the following modifications of the array platform were realized: (I) the substrate for DNA-Microarray production had to be switched to slides from a different manufacturer, (II) the immobilization chemistry was standardized for all probes and (III) an easily expandable modular organization was chosen as layout (Figure 1).

At the time of design, the chip prototypes contained nearly all known mutations in the target genes. Naturally, a DNA microarray based genotyping platform has to be updated as new mutations emerge and are described. This was done in the course of this study for the TEM- and SHV-chip modules, adding altogether 25 new probe sets for the genotyping of 11 further polymorphisms. Consequently, the current version of the ESBL chip includes probe sets for the identification of 99 % of all TEM- and 89 % of all SHV-variants published (<http://www.lahey.org/studies/>). All positions associated with ESBL activity and inhibitor resistance were included. Probes within the CTX-M chip module cover CTX-M group determination, identification of 82 % of all known CTX-M group M1 lactamases as well as 83 %, 50 % and 50 % of all group M2, group M9 and group M8/M25-lactamases.

ESBL chip development

Apart from the technical integration and updating the biological coverage of the chip, different tasks regarding microarray and assay optimization had to be accomplished, namely optimization of the hybridization conditions, establishment of an amplification strategy for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M} and development of a sophisticated probe design to enhance probe specificity and probe design flexibility.

Using reference material with known gene variants, the hybridization conditions were reconsidered and compared to own previous work resulting in adjustments of hybridization temperature, SSPE-buffer concentration and the addition of SDS. As standard conditions, the hybridization of fragmented target DNA was carried out for one hour at 47 °C in a solution containing 2x SSPE and 0.1 % SDS. Applying these optimized conditions, which demonstrate more stringent conditions than used beforehand, resulted in a more specific hybridization without much loss of absolute signal intensity and a cleaner background due to the applied SDS. As another consequence, four probe sets had to be redesigned. The application of an automated hybridization station resulted in a hybridization procedure of only 90 min including washing and drying steps. The data acquisition was immediately possible afterwards.

For the production of target DNA, plasmid DNA isolated from clinical samples or from reference material was amplified by PCR. For the simultaneous genotyping of different gene targets a multiplexed amplification and labeling strategy is desirable. TEM and SHV genes were amplified and labeled with Cy3 using a robust dualplex PCR. Amplification product sizes were 867 bp and 927 bp respectively. The integration of the CTX-M amplification into a multiplexed format which would simultaneously amplify and label the whole TEM, SHV and CTX-M genes was dropped due to the formation of hetero-dimers between primers specific for the different CTX-M groups. Instead, PCR primers for the parallel amplification of the CTX-M genes, using the same conditions as for the TEM/SHV dualplex PCR, were developed. For a more efficient amplification during the validation of the Microarray with clinical samples, regarding sample material and PCR reagents, CTX-M target DNA was amplified with group specific primers in a singleplex PCR after clarifying the allocation to a

Summary

certain CTX-M group by using a multiplex screening PCR. The PCR product sizes for CTX-M1 and CTX-M9 group members were 864 bp and 870 bp respectively. The Cy3 incorporation rates were similar for all labeling PCRs applied. The mean nucleotide (NT) to Cy-3 (fluorophore, F) ratios (variation depending on template quality) of the TEM/SHV PCR products were 84 (45 to 170) and 97 (56 to 173) for the CTX-M group specific PCR products.

The performance of an individual probe set was assessed with regard to its discrimination power for various DNA targets. This was expressed as the mismatch to perfect match ratio (MM/PM). For allele specific hybridization, as chosen as a format in the presented microarray, the probe position relative to the target greatly is fixed if single nucleotide polymorphisms shall be detected. However, at certain positions it was impossible to select probes, because stable secondary structures would have formed within the probes themselves, rendering a meaningful detection impossible. Therefore, as an alternative probe design strategy, the incorporation of artificial mismatches at positions involved in the undesired secondary structure formation at difficult target positions was chosen. The performance of the alternatively designed probe sets were always evaluated comparing them to probe sets without artificial mismatches targeting the same position. Altogether in six cases, the alternative probe design made a correct identification possible or significantly improved the discriminatory power. For example, for the probe set SHV 61 the substitution of a Cytosine by Thymine at a position significantly involved in dimer formation shifted the highest hybridization signal, when hybridizing SHV-1 target DNA, from the wrong A- to the correct C-probe. The highest mismatch signal of the resulting probe set showed only 52 % of the perfect match signal. In another case, the performance of the already correct working probe set TEM 224, when hybridizing TEM-116 target DNA was further improved by the same method. Here, the average RI_{MM} value was decreased from 0.32 to 0.11.

Testing of clinical isolates

The performance of the integrated and optimized ESBL chip was validated using 60 blinded samples containing DNA isolated from clinical samples collected in clinical routine of the Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine at the Robert Bosch Hospital (RBK) in Stuttgart and the Institute of Medical Microbiology and Hygiene of the J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main. 58 samples were phenotypically characterized as 'ESBL positive' using standard laboratory procedures for susceptibility testing (agar diffusion using CLSI breakpoints; VITEK 2). Two samples showed an ambiguous or 'ESBL negative' phenotype (Iso-23 and Iso-62). The identified species were mainly *E. coli* and different *Klebsiella* species but also one isolate of *E. sakazakii*, *E. intermedium*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, and *R. aquatilis* each (Table 1).

Prior to the genotyping with the integrated ESBL chip, all samples were screened for the presence of the target genes by a screening PCR protocol. As a result 63 % of all 60 isolates were positive for *bla*_{TEM}, 38 % for *bla*_{SHV}, 70 % for *bla*_{CTX-M}, and 3 % were negative for all targets. The further identification of the isolates' beta-lactamase genotype was based on a hierarchical read-out of the DNA microarray signals after labeling PCR and hybridization to the integrated ESBL chip. The gene family level was determined by the process controls which act as gene family specific probes. The classification of CTX-M genes into subgroups (M1, M2, M9, and M8/25) was done by four probe sets. The beta lactamase gene variant was identified by signal patterns exhibited by the probe sets corresponding to the interrogated mutation positions (Table 1).

In 54 isolates an ESBL gene variant was detected, whereas 6 isolates contained no TEM, SHV or CTX-M derived ESBL. All TEM genes encoded for TEM-1 meaning that no ESBL phenotype could be assigned to TEM. For SHV, a range of gene variants was detected covering SHV-1, SHV-12, and SHV-5. CTX-M-15 and CTX-M-3 were found as members of CTX-M group M1 and CTX-M-9, CTX-M-14, and CTX-M-14b as members of the group M9.

Chip results and DNA-sequencing were 100 % concordant. SHV- and CTX-M-ESBLs were detected in the following combinations: CTX-M (39/54), SHV (12/54), 2x CTX-M (2/54) and SHV + CTX-M (1/54). SHV-12 was the most prevalent SHV-ESBL (11/13), CTX-M-15 the most frequent CTX-M-ESBL (34/42) and also the predominant ESBL within all 60 isolates.

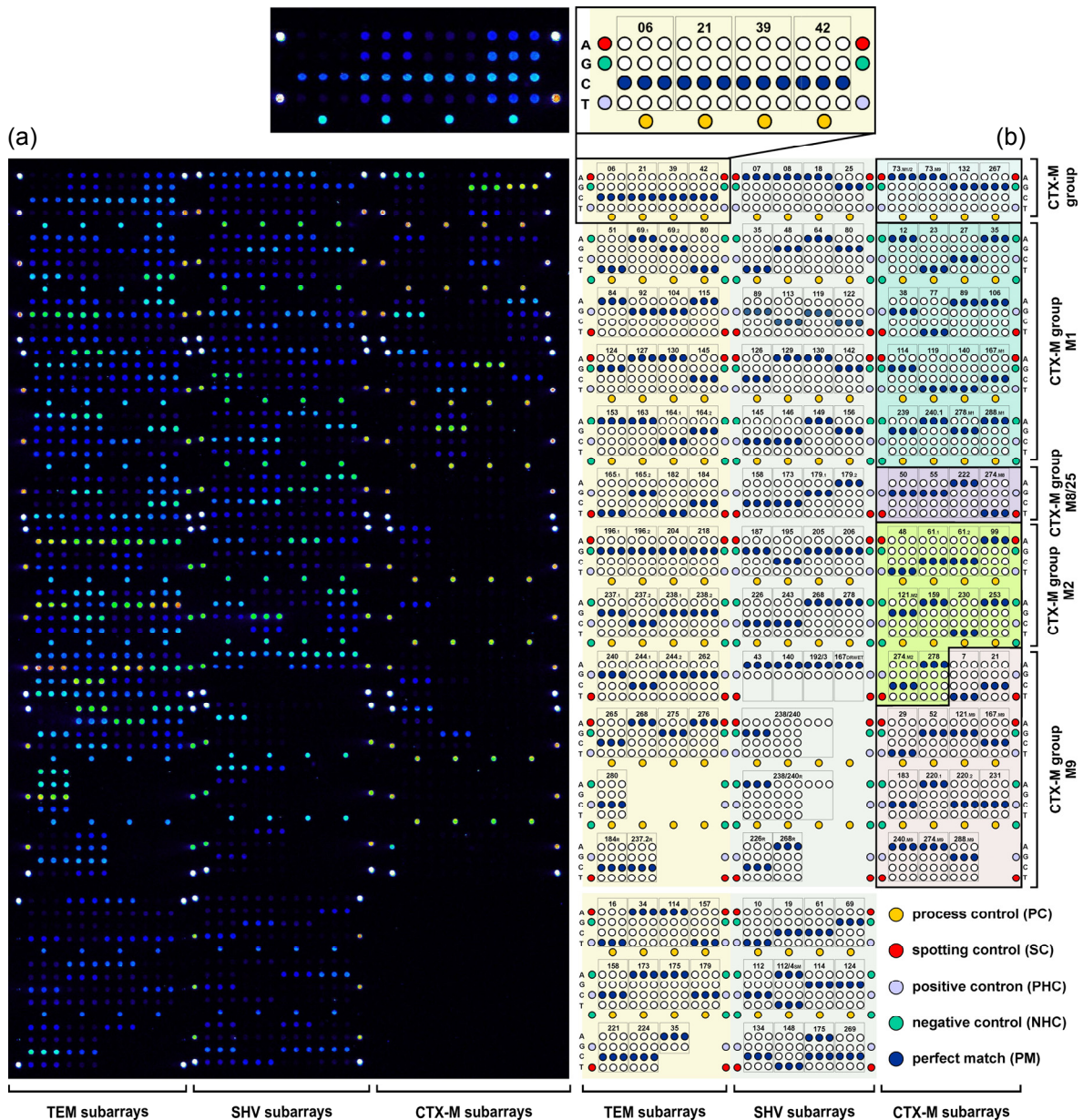


Figure 1: Chip layout. (a) Fluorescence image after hybridization with 200 ng labeled TEM-1/SHV-1 (NT/F=71) and 150 ng CTX-M-15 (NT/F=97) target DNA (Iso-37, PMT: 60 %). The signal intensity is encoded in the 65,636 gray scales of the 16-bit TIF image. (b) Schematic representation of the modular layout of the oligonucleotide microarray. The areas specific for the different lactamase genes and the different subgroups of the CTX-M type genes are labeled. The enlarged part describes in detail the arrangement of the A, G, C and T probes of each probe set. Theoretical perfect matches after hybridization with TEM-1, SHV-1, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 and CTX-M-9 respectively are highlighted in dark blue. * The process controls (PCs) are group-specific detection probes targeting either *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, or *bla*_{CTX-M}.

Table 1: Genotyping of clinical isolates

No ^a	Isolate	Microarray result ^b			MIC			
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX	CAZ	CTX/CAZ	ESBL ^c
24 ⁻	<i>E. sakazakii</i>	TEM-1	SHV-12	-	4	32	<1	-
55 ⁻	<i>K. oxytoca</i>	TEM-1	SHV-12	-	4	8	<1	POS
25 ⁻	<i>Klebsiella spec.</i>	-	SHV-12	-	16	>=64	<1	-
2 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	16	>=64	<1	POS
12 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	>=64	>=64	-	POS
36 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	4	>=64	<1	POS
1 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	-
15 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	-
17 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	>=64	>=64	-	-
52 ⁻	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	POS
5 ⁺	<i>E. coli</i>	-	SHV-5	-	1	>=64	<1	POS
19 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-5	-	>=64	>=64	-	POS
49 ⁻	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	SHV-12	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
13 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
18 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
20 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	32	>1	POS
26 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
33 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	32	>1	NEG
38 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
40 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
48 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
60 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
61 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
6 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
9 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
30 ⁻	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
32 ⁻	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
34 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
57 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
3 ⁺	<i>E. intermedium</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
29 ⁺	<i>K. oxytoca</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
7 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
16 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
37 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
10 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	-	-	-	POS
35 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
42 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
11 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
22 ⁻	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
50 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
14 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
28 ⁺	<i>K. terrigena</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
21 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
51 [*]	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
8 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-3	32	4	>1	POS
56 ⁻	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-3	16	<=1	>1	POS
59 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15 + CTX-M-14b	>=64	>=64	-	POS
27 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15 + CTX-M-14b	>=64	>=64	-	POS
4 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
39 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
58 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
46 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-9	4	>=64	<1	POS
41 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-9	>=64	4	>1	POS
47 ⁺	<i>P. vulgaris</i>	-	-	CTX-M-9	-	-	-	-
44 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	32	>=64	<1	POS
53 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	>=64	16	>1	POS
31 ⁻	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	32	>=64	<1	POS
54 ⁻	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	32	>=64	<1	-
62 ⁻	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	SHV-1	-	-	-	-	-
23 ⁻	<i>Rahnella aquatilis</i>	-	-	-	<=1	<=1	-	-

^a Data was first sorted for different genotypes detected and then clustered for species. Isolate numbers were used as a label for the blinded plasmid isolates received from our partners: * samples collected in Stuttgart; + samples collected in Frankfurt.

^b Array results were validated by standard DNA sequencing of the PCR product received.

^c The VITEK ESBL test is FDA approved only for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*.

With the phenotypic characterization as the gold-standard, the genotypes delivered by the DNA microarray based assay explained the phenotype of 56 of the 60 isolates, resulting in 93 % sensitivity and 100 % specificity. The high specificity, however, clearly originates from the small number of only two 'ESBL-negative' isolates available in this study. Future studies will address this task. The sensitivity was achieved by correct identification of 54 out of the 58 phenotypically as resistant characterized samples. Only in four isolates the resistant phenotype could not be explained by the presence of a TEM-, SHV- or CTX-M-ESBL gene (Iso-31, Iso-44, Iso-53, Iso-54). As a CMY type AmpC beta-lactamase could be experimentally excluded for the three *E. coli* isolates (Iso-31, Iso-44, Iso-53), possible explanations for the resistant phenotype are: the presence of other plasmid-encoded cephalosporinases, promoter mutations within the chromosomal *ampC* gene, metallo lactamases or alterations of the membrane composition. An inaccurate phenotypic characterization is also possible. The fourth false negative sample contained a *C. freundii* which could harbor a derepressed chromosomal *ampC* gene. For all positive isolates, the substrate spectra connected to the identified gene variants and the phenotypically measured MIC data correlated very well. This was especially noted in the increased hydrolytic activity against ceftazidime of the CTX-M-15 variant compared to most other CTX-M variants, predominantly CTX-M-3 (differs in only one point mutation CTX-M-15) (Table 1). A comparison of the prevalence and spread of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe with the ESBL genes identified in this study revealed a high concordance with the current resistance situation e. g. CTX-M enzymes have become predominant and the *bla*_{CTX-M} genes were also by far the most prevalent ESBL genes found among the tested isolates, with CTX-M-15 being the most prominent variant. Interestingly, comparing the source of the isolates with the ESBL-typing results, the two *E. coli* isolates which harbored two CTX-M-ESBLs (each CTX-M-15 and CTX-M-14b) turned out to be from the same patient but different specimen (Iso-27, urine; Iso-59, respiratory sample).

Chip performance

For the performance analysis, all experiments leading to the same perfect match signals were subsumed as replications. Consequently, a large data set from 120 hybridized chips with the preceding PCR reactions and different incorporation rates of the target DNA hybridized were considered. The system showed a very high reproducibility as the relative signal intensities of the mismatch probes (RI_{MM}) deviated only at an average of approximately 3 % of the corresponding perfect match signals ($RI_{MM} \pm 0,033$). The performance of the ESBL chip was assessed according to the distribution of RI_{MM} values across defined RI_{MM} ranges as displayed in Figure 2. For the whole ESBL chip 94 % of all mismatch signals had a $RI_{MM} < 0.4$, which demonstrated an excellent discrimination capacity of the set-up. The three chip modules showed similar distributions of mismatch signals with the SHV chip being the most specific (Fig. 2b). Due to a sophisticated probe design the vast majority of the 150 individual probe sets identified the present nucleotide without ambiguity. Not fully optimal with RI_{MM} values between 0.5 and 0.7 were TEM 42, TEM 280, TEM 237.2, SHV 43, CTX-M 231, CTX-M 23 and CTX-M 77. These probe sets are potential candidates for improvement by redesign. The only probe set which did not work correctly in all relevant hybridizations was CTX-M 29. However, during the important evaluation of cross reactivities between probe sets of the different chip modules, this behavior could be assigned to an artifact of the array printing process and not probe properties. Detected cross hybridization did not show significant influences on the discriminatory power of the probe sets with one exception: CTX-M 52. The limited functionality of this probe set after simultaneous hybridization of members of the CTX-M1 and M9 gene groups has to be considered during interpretation of the result.

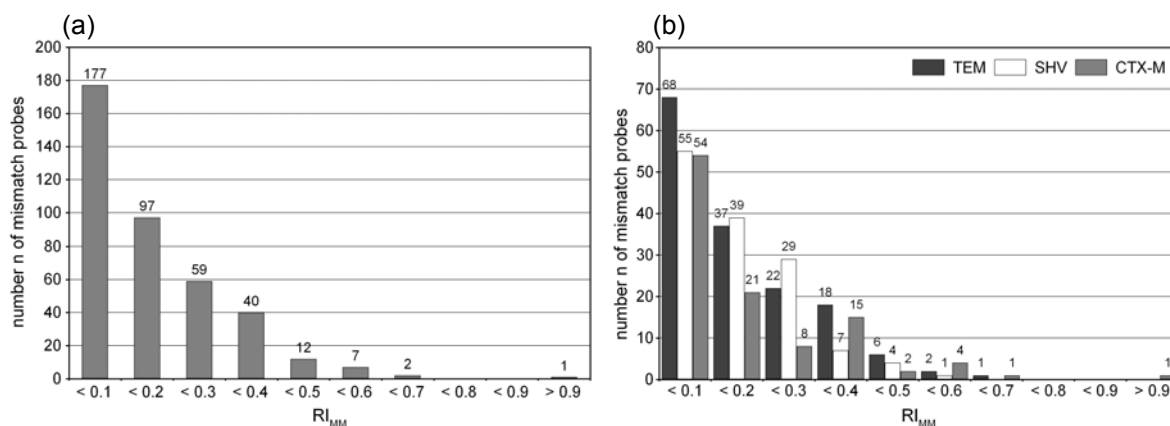


Figure 2: Performance of (a) the whole chip and (b) the individual chip modules. The Distribution of RI_{MM} values across different RI_{MM} ranges is displayed. The total amount of mismatch probes is 394 for the whole chip and 154, 135 and 105 for the TEM, SHV and CTX-M chip modules. Relative intensities of the probe sets are averaged from data of all clinical isolates harboring the TEM-1 (n = 38), SHV-1 (n = 10), CTX-M-15 (n = 34) and CTX-M-14/M9 (n = 3 to 8) gene respectively.

One remarkable property of the ESBL chip is its ability to detect mixed genotypes of the same beta-lactamase group in a robust manner. In our study samples Iso-1, Iso-2, Iso-12, Iso-15, Iso-17, Iso-36 and Iso-52 were found positive by the chip for SHV-12 in the presence of SHV-1. The chip could clearly discriminate between the signals obtained at the relevant positions for isolates containing either SHV-1, SHV-12 or a mixture as the signals of the T-probe at position 35 and the GEg-probe of probe set 238/240 were significantly different (non-overlapping confidence intervals, t-test with p-value < 0.05). In the Sanger sequencing results, which were used for confirmation, clear double peaks were apparent at the mutation sites. For samples Iso-59 and Iso-27 two CTX-M ESBLs were detected simultaneously, namely CTX-M-15 and CTX-M-14b. The group discrimination probe set 267 is relevant for CTX-M mixtures. The signal at the T-probe of this probe set was significantly different when CTX-M-14b hybridized in addition to a M1 member compared to CTX-M-15 alone.

The overall assay time of 4.5 hours after DNA extraction can compete with the current, cultivation based methods. With a hybridization time of only one hour and the inalienability of a target DNA fragmentation, one of the few starting points for further reducing the assay time is the applied PCR strategy. This has to be reviewed at a later date in combination with the evaluation of the assay sensitivity, as the applied PCR reactions are the bottle neck of the method regarding this feature.

Detection of AmpC- and OXA beta-lactamases

To extend the coverage of the ESBL chip for other relevant beta lactamases and therefore its clinical value, a new DNA microarray prototype for the detection and identification of approximately 40 plasmid-mediated AmpC beta lactamases was developed. The chip comprises altogether 155 specific probes for *ampC* gene group identification (process controls) and genotyping of 37 polymorphisms within the six different *ampC* gene groups. The probes were designed according to specifications, which will allow a smooth integration into the ESBL chip. The chip was tested with two members of the *C. freundii*-group (CIT) of plasmid-encoded *ampC* genes, which were originally found in clinical *E. coli* isolates (Figure 3). A PCR protocol for the amplification of *ampC* genes from this group, using the same conditions as for the TEM/SHV dualplex PCR, was successfully established. The array could unambiguously identify AmpC variants as CMY-2 and CMY-16. As the validation of the AmpC chip with members of the other *ampC* gene groups is not yet completed and hybridizations were carried out under less stringent conditions as described for the ESBL chip (see optimization of hybridization conditions), concluding statements regarding the performance of the individual probe sets should be postponed. However, the probes relevant for the discrimination of the tested variants worked excellent.

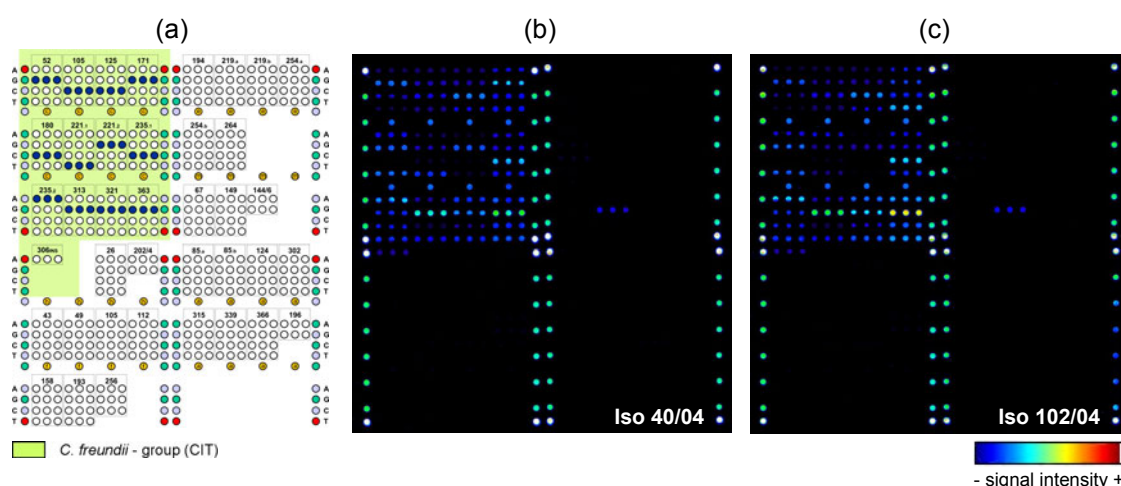


Figure 3: (a) Layout of the developed AmpC-Chip. The area specific for plasmid encoded AmpC beta-lactamases of the *C. freundii*-group is labeled in green color. Theoretical perfect matches after hybridization of CMY-2 are highlighted in dark blue. Fluorescence images after hybridization with 150 ng labeled target DNA of (b) CMY-2 (Iso-40/04, 62 NT/Cy3, PE-Scanner-PMT: 55 %) and (c) CMY-16 (Iso-102/04, 65 NT/Cy3, PMT: 55 %).

During the course of the GenoMik project, a microarray prototype for the detection and identification of beta lactamases belonging to the OXA groups I, II (OXA-ESBLs) and V (OXA carbapenemases) was developed and validated with target DNA of members of group I and II. The chip consists of 148 specific probes for the identification of approximately 44 different OXA type beta lactamases and their group membership. The oligonucleotide probes were also designed to match the probe properties of the other ESBL chip modules. In this work, the validation of this array could be completed, using blinded clinical samples containing genes of the subgroups 1-3 of OXA group V (Figure 4). For the amplification of the different genes several previously described PCR protocols were established. The chip could identify all variants correctly and specifically assign the hybridized target to the correct group and different subgroups. Using optimized hybridization conditions in a manual hybridization, the individual probe sets showed good performances. In a few cases low absolute signal intensities could be assigned to mismatches of individual probe sets to particular variants,

Summary

which was due to the low homology of the genes within the same group. Nevertheless all probe sets could be analyzed due to a clean background and showed correct specificities. Only probe sets OXA 3.24, OXA 2.142 and OXA 2.257 are candidates for improvement by redesign.

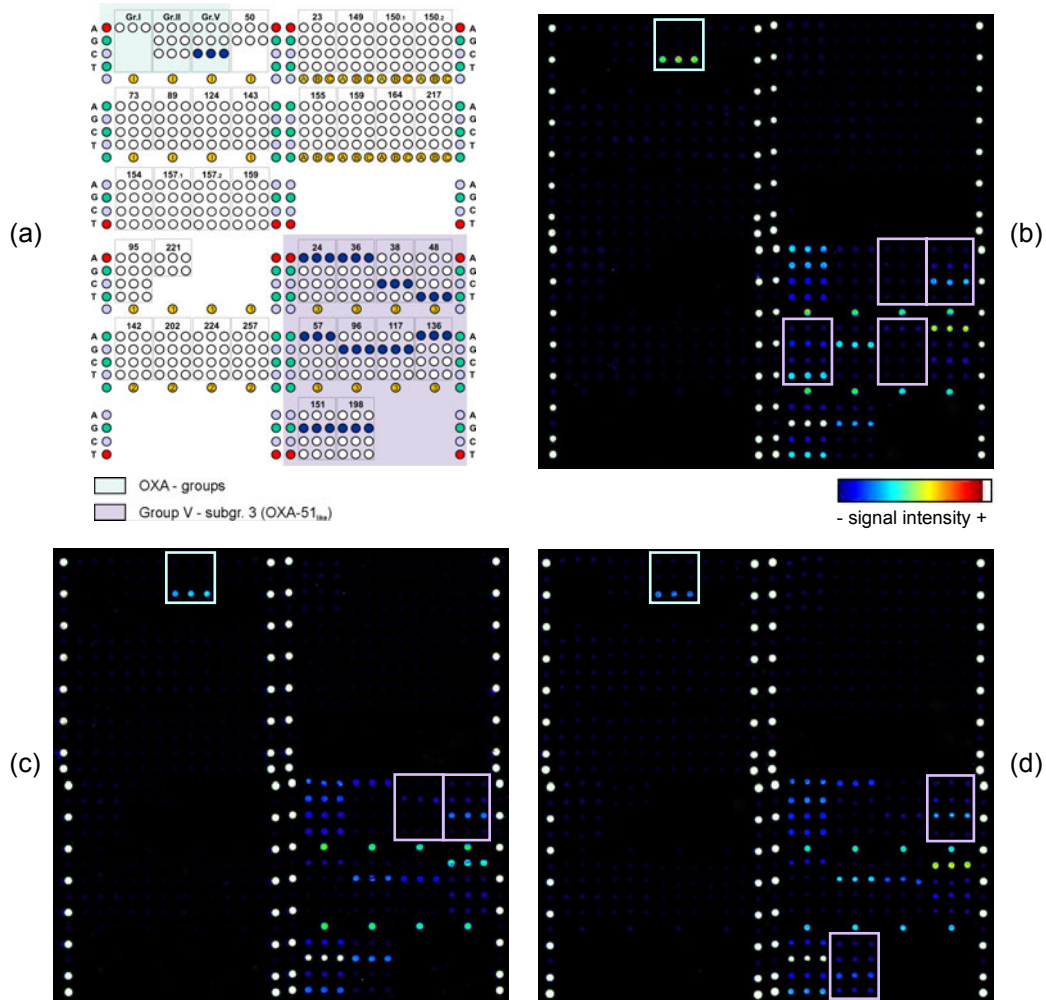


Figure 4: (a) Layout of the OXA-Chip. The areas specific for OXA beta-lactamases of the subgroup 3 of group V and OXA group discrimination are labeled in color. Theoretical perfect matches after hybridization of OXA-51 are highlighted in dark blue. Fluorescence images after hybridization with 200 ng labeled target DNA of (b) OXA-69 (Ab15, Tecan-Scanner-PMT: 170 %), (c) OXA-62 (Ab62, PMT: 160 %) and (d) OXA-70 (Ab79, PMT: 170 %).

Conclusion and outlook

The developed integrated oligonucleotide microarray for the genotyping of TEM, SHV, and CTX-M beta-lactamases has been shown to be a robust tool for the detection and identification of gene variants of ESBL-type beta-lactamases within 4.5 hours, starting from isolated DNA. This method appears to be an attractive option for rapid identification or confirmation of beta lactam resistance. Its integration into the clinical laboratory routine could contribute to a more adequate use of antibiotics and the positive therapeutic and ecological effects associated to that, as well as reducing selective pressure. Additionally, its already high coverage suggests a great value for monitoring the spread of these resistance genes in the clinical setting and in the community.

The integration of the developed and successfully validated probes for the genotyping of plasmid encoded AmpC beta lactamases and OXA type genes associated with broad spectrum cephalosporin and carbapenem resistance will increase the value of the resistance information obtained by the chip in the future. The further integration of probes targeting minor or infrequent *bla*-genes is possible and underway. Studies which retrospectively correlated different ESBL-types, including some SHV-variants detected in the presented thesis, with treatment outcomes of infections caused by *E. coli* and *K. pneumoniae*, antibiotic therapy failed when ESBL-producing strains were treated empirically with an extended-spectrum cephalosporin. If a clinician would be enabled to use the described array to guide his decision about therapy, the treatment choice could be amended to a carbapenem antibiotic (e.g. imipenem). However, intervention studies, which evaluate the clinical value of genotypic methods for resistance testing and the outcomes of their usage, are urgently needed in the future. Technology wise, microfluidic systems, which integrate the microarray analysis with different assay steps, e. g. sample preparation, isolation of the compound of interest, target amplification and readout, will enable an easy, secure and economically efficient handling of pathogen detection and characterization in the clinic.

1. Einleitung

1.1. β -Lactam-Resistenz – Hintergrund

Die Entdeckung des Penicillins durch den englischen Bakteriologen Alexander Fleming 1928 und die Demonstration dessen therapeutischen Potentials 1940 durch Florey und Chain war eine der größten Sternstunden in der Entwicklung von Arzneimitteln (Chain et al. 1940; Fleming 1929). Die Einführung von Penicillinen zur Behandlung bakterieller Infektionen in einer späten Phase des Zweiten Weltkriegs war Ausgangspunkt für die Entdeckung weiterer antibiotisch wirksamer Substanzen (z. B. Streptomycin) und die Weiterentwicklung der auf Penicillin G basierenden β -Lactam-Antibiotika (Rolinson 1998). Durch die Entwicklung halbsynthetischer Penicilline und Cephalosporine bis hin zu weiteren Gruppen wie z. B. Carbapenemen oder Monobactamen, ist die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika heutzutage nicht nur die am häufigsten verwendete, sondern auch die vielseitigste Antitibiotikaklasse hinsichtlich chemischer Eigenschaften, antibakteriellem Spektrum und Art der Verabreichung (Cornaglia et al. 2008). Weitere positive Eigenschaften wie geringe Kosten, Verfügbarkeit und geringe Nebenwirkungen führten zu einem weit verbreiteten, teilweise übermäßigen Einsatz von β -Lactamen seit mehr als 60 Jahren. Die breite Verwendung verschiedener Generationen von β -Lactam-Antibiotika führte jedoch unweigerlich zu einem vermehrten Auftreten resistenter Erreger (Walsh und Wright 2005). Dieser Trend schränkt die Behandlungsoptionen einiger Infektionskrankheiten bereits heute deutlich ein, so dass günstige Medikamente erster Wahl oft keine Wirkung mehr zeigen. Da die Erfolge bei der Suche nach neuen Antibiotika-Leitstrukturen in den letzten Jahrzehnten sehr beschränkt waren, ist es von immenser Bedeutung, die Wirksamkeit der β -Lactam-Antibiotika zu erhalten.

1.1.1 β -Lactam-Antibiotika und ihre Wirkungsweise

β -Lactam-Antibiotika gehören zur Klasse der Aminosäure- und Peptidantibiotika und besitzen einen charakteristischen viergliedrigen β -Lactam-Ring, der als Teil einer bicyclischen Struktur (z. B. Penicilline und Cephalosporine) oder isoliert (z. B. Monobaktam) vorliegen kann. Seit der Entdeckung des Penicillins wurden eine Vielzahl natürlicher, halbsynthetischer und synthetischer β -Lactame beschrieben und in folgende Gruppen eingeteilt: (I) Penicilline, (II) Cephalosporine (inklusive Cephamyne), (III) Carbapeneme und (IV) Monobactame. Auch β -Lactamase-Inhibitoren besitzen einen β -Lactam-Ring, sind jedoch selbst nicht antibiotisch wirksam. Neben dem klassischen Penicillin G (Benzylpenicillin) zeigt Tabelle 1-1 eine Auswahl weiterer wichtiger β -Lactam-Antibiotika und β -Lactamase-Inhibitoren.

Alle β -Lactam-Antibiotika wirken bakterizid, indem sie einen entscheidenden Schritt der Synthese der bakteriellen Zellwand während der Zellteilung hemmen. Die Zellwände von sowohl gramnegativen wie auch grampositiven Bakterien besitzen eine Schicht aus dreidimensional vernetztem Peptidoglykan, das auch Murein genannt wird. Das Peptidoglykan umschließt die bakterielle Zelle wie ein Korsett und hilft so den hohen osmotischen Druck zu kompensieren, der zwischen Zellinnerem und Umgebung wirkt. Es muss während des gesamten Zellzyklus intakt bleiben und unterliegt daher einem stetigen Auf-, Ab- und Umbau. Die Glykan-Komponente des Peptidoglykans besteht aus den beiden Grundbausteinen N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG), die abwechselnd über β -(1,4) glykosidische Bindungen zu langen, unverzweigten Polysaccharid-Ketten verbunden sind. Die Quervernetzung der Polysaccharid-Ketten erfolgt durch kurze charakteristische Peptidseitenketten, die an den NAM-Bausteinen angeheftet sind. Dieser Schritt wird von bakteriellen Transpeptidasen katalysiert: Diese spalten die Bindung zwischen den beiden endständigen D-Alanin-Resten des NAM-Pentapeptids und verknüpfen

die freigewordene Carboxylgruppe mit einer freien Aminogruppe eines zweiten Oligopeptids. Das endständige D-Alanin wird dabei freigesetzt (Buynak 2007).

Diese bakteriellen Transpeptidasen sind die Zielstrukturen der β -Lactam-Antibiotika. Der β -Lactamring dieser Antibiotikaklasse ist dem natürlichen Substrat der Transpeptidasen (Peptidbindung zwischen den terminalen D-Alanin-Resten des NAM-Pentapeptids) sterisch ähnlich und kann daher kovalent an das Enzym binden (Babic et al. 2006). Die Transpeptidasen werden daher auch als Penicillin-Binde-Proteine (*penicillin binding proteins*) oder PBPs bezeichnet. Aufgrund der kovalenten Bindung des β -Lactams im aktiven Zentrum des Enzyms (Acyl-Enzym-Zwischenprodukt) und der im Gegensatz zum natürlichen Substrat nur sehr langsamen Hydrolyse der erstandenen Ester-Bindung (Deacylierung), stehen die Transpeptidasen nicht mehr für den finalen Schritt der Peptidoglykan-Biosynthese zur Verfügung. Ohne die essentielle Quervernetzung kann die Zellwand dem osmotischen Druck nicht standhalten. Zusätzlicher enzymatischer Abbau der Zellwand führt schließlich zur Bakteriolyse (McDowell und Reed 1989).

In Deutschland ist die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika seit Jahren sowohl im ambulanten Bereich als auch im Krankenhaus die am häufigsten verwendete Antibiotikaklasse (GERMAP 2008). Im Vergleich der europäischen Länder nimmt Deutschland, was die Höhe des Antibiotikaverbrauchs im ambulanten Bereich betrifft, eine Position im unteren Drittel ein. Während im ambulanten Bereich überwiegend Penicillin-Derivate (zumeist Amoxicillin) verordnet werden, kommen im Krankenhaus meist Intermediärspektrum- β -Lactame (z. B. Cefuroxim) zum Einsatz. 2004 waren neun der Top 15 im Krankenhaus verordneten und parental verabreichten Substanzen β -Lactam-Antibiotika oder β -Lactam/ β -Lactamase-Inhibitor-Kombinationen.

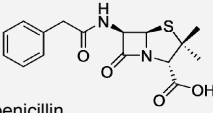
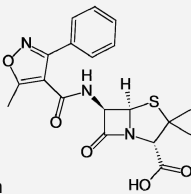
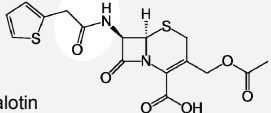
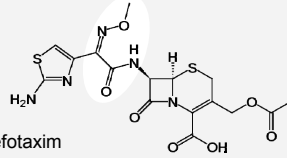
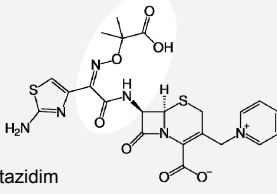
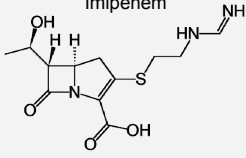
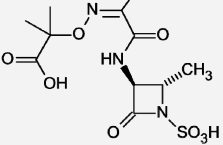
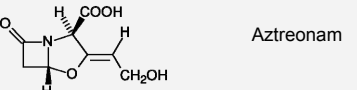
1.1.2 Resistenzmechanismen

Klinisch relevante Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika kann durch folgende drei Resistenzmechanismen vermittelt werden, die teilweise allein, aber auch in Kombination auftreten können: (I) Bildung modifizierter Zielstrukturen, (II) Reduktion der Antibiotikakonzentration an der Zielstruktur und (III) Produktion inaktivierender Enzyme (Heisig 2006). Die Produktion veränderter Transpeptidasen (PBP) mit keiner oder geringer Affinität zu β -Lactamen ist der vorherrschende Resistenzmechanismus bei grampositiven Bakterien (z. B. *Staphylococcus*, *Streptococcus*), wurde aber auch bei gramnegativen Bakterien beobachtet (z. B. *Neisseria gonorrhoeae*). Beispiele für β -Lactam-insensitive PBPs sind PBP2x aus Penicillin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), PBP2a aus Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und PBP5fm aus *Enterococcus faecium* (Grebe und Hakenbeck 1996; Hartman und Tomasz 1984; Sifaoui et al. 2001). Während PBP2x ein durch Mutation verändertes *S. pneumoniae*-Enzym darstellt handelt es sich bei dem durch das *mecA*-Gen codierte PBP2a aus MRSA um ein zusätzlich erworbenes Enzym, das die Transpeptidase-Aktivität des β -Lactam-sensitiven PBP2 von *S. aureus* übernimmt (Pinho et al. 2001). PBP5fm ist für die natürliche Unempfindlichkeit von *E. faecium* gegenüber β -Lactam-Antibiotika verantwortlich (Rice et al. 2004; Sifaoui et al. 2001). Bei gramnegativen Bakterien spielt die Reduktion der Antibiotikakonzentration im periplasmatischen Raum durch eine Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran oder durch aktives Entfernen des β -Lactams mit Hilfe von Effluxpumpen eine Rolle. Eine Verringerung der Membranpermeabilität wird durch eine geringere Anzahl an Porinen erreicht. Porine sind membrandurchspannende Proteine der äußeren Membran (*outer membrane proteins* – OMP), welche den unspezifischen Transport von hydrophilen Substanzen (wie z. B. β -Lactam-Antibiotika) durch die Membran erlauben. Carbapenem-Resistenz bei *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae* konnte z. B. auf den Verlust von OMP D2 bzw. OmpK35 und OmpK36 zurückgeführt werden (Jacoby et al. 2004; Martinez-Martinez 2008; Satake et al. 1991). Ein prominentes Beispiel für aktiven Transport

Einleitung

des Antibiotikums aus der Zelle ist das MexAB-OprM-System bei *P. aeruginosa* (Poole 2005).

Tabelle 1-1: Einteilung der β -Lactam Antibiotika

Gruppe	Einteilung	Wichtige Substanzen	Wichtige Strukturen			
Penicilline						
Breites Spektrum	Aminopenicilline	Amoxicillin Ampicillin Epicillin	 Benzylpenicillin			
	Carboxypenicilline	Carbenicillin Ticarcillin				
	Ureidopenicilline	Piperacillin Mezlocillin				
	Amidinopenicilline	Pivmecillinam				
	Enges Spektrum	β -Lactamase sensitiv		Benzylpenicillin (G) Phenoxymethylpenicillin (V)	 Oxacillin	
β -Lactamase resistent		Oxacillin Cloxacillin Methicillin				
Cephalosporine						
1. Generation		Cefazolin Cefalotin Cefaloridin	 Cefalotin			
	2. Generation	Cephamycine		Cefaclor Cefamandol Cefuroxim		
Cefoxitin Cefotetan Cefmetazol			 Cefotaxim			
3. Generation				Cefpodoxim Cefotaxim Ceftazidim Ceftriaxon		
				4. Generation	Cefepim Cefpirom	 Ceftazidim
Andere Gruppen						
Carbapeneme		Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem	 Imipenem			
	Monobactame	Aztreonam				
β -Lactamase Inhibitoren		Sulbactam Tazobactam Clavulansäure	 Clavulansäure			
	β -Lactam/Inhibitor-Kombinationen	Ampicillin/Sulbactam Piperacillin/Tazobactam Amoxicillin/Clavulansäure		 Aztreonam		

Der wichtigste Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien gegenüber β -Lactam-Antibiotika ist die Produktion von Enzymen, die den β -Lactamring hydrolysieren und so das Antibiotikum in eine inaktive Form überführen, bevor es seine Zielstruktur erreicht (Fisher et al. 2005). Diese Enzyme werden β -Lactamasen genannt. β -Lactamasen wurden zwar auch in grampositiven Bakterien nachgewiesen, besitzen hier aber nicht dieselbe Relevanz wie β -Lactam-insensitive PBPs, oder kommen in Kombination mit diesen vor. Einige β -Lactamasen spalten den β -Lactamring mit Hilfe bivalenter Kationen (Zn^{2+} , Metallo- β -Lactamasen). Die weitaus größere Zahl der β -Lactamasen verwendet jedoch einen aktivierten Serin-Rest für den nukleophilen Angriff auf die Amidbindung des β -Lactamrings (Serin- β -Lactamasen). Der erste Teil des Reaktionsmechanismus der Serin- β -Lactamasen wird als Acylierungsschritt bezeichnet und beginnt mit der Bildung eines nicht kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes (Michaelis-Komplex). Nach Angriff des β -Lactamrings durch den durch eine katalytische Base aktivierten Serin-Rest, entsteht über einen tetrahydralen Übergangszustand ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt, in welchem das Substrat vorübergehend in Form eines Esters kovalent an das katalytische Serin gebunden ist. Im darauffolgenden Deacylierungsschritt wird das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt mit Hilfe eines, ebenfalls durch eine katalytische Base aktiviertes Wassermolekül, hydrolysiert, wobei ein tetrahydraler Übergangszustand in regeneriertes Enzym und Produkt (inaktiviertes β -Lactam-Antibiotikum) zerfällt.

Um die Hydrolyse des Antibiotikums durch β -Lactamasen zu verhindern und damit der Resistenz Einhalt zu gebieten, gibt es zwei prinzipielle Ansätze: (I) β -Lactamase-Inhibitoren, die strukturell den β -Lactam-Antibiotika ähnlich sind und ebenfalls kovalent an das aktive Serin gebunden werden, jedoch nur langsam oder gar nicht hydrolysiert werden. Sie belegen damit das aktive Zentrum der β -Lactamase und beeinträchtigen so die Funktion des Enzyms. Derzeit werden drei β -Lactamase-Inhibitoren als Kombinationstherapie mit β -Lactamen eingesetzt: Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam (siehe Tabelle 1-1). (II) Entwicklung von β -Lactam-Antibiotika, die eine hohe Affinität zur Zielstruktur haben (PBPs), aber nicht oder nur schlecht von β -Lactamasen hydrolysiert werden. Dieses Grundprinzip führte zu Cephalosporinen mit breitem Wirkspektrum (z. B. Drittgenerations-Cephalosporine mit Oxyimino-Seitenketten) oder Carbapenemen (Babic et al. 2006).

1.1.3 Einteilung der β -Lactamasen

Bis heute sind bereits über 530 verschiedene β -Lactamasen bekannt (Babic et al. 2006). Für die Differenzierung dieser Vielzahl an Enzymen können folgende Parameter herangezogen werden: (I) Die verschiedenen Substratprofile und das Verhalten einer β -Lactamase gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren. (II) Erfolgt die Hydrolyse des β -Lactamrings mit Hilfe eines katalytisch aktiven Serin-Rests (Serin- β -Lactamasen) oder bivalenten Kationen (Zn^{2+} , Metallo- β -Lactamase). (III) Ist das β -Lactamasegen (*bla*) auf einem Plasmid oder chromosomal codiert. (IV) Physikalische Eigenschaften wie relative Molekülmasse und isoelektrischer Punkt (Wiegand 2003). Diese und weitere molekulare Unterschiede können für die Einteilung der β -Lactamasen in verschiedene Gruppen verwendet werden. Es sind mehrere Klassifizierungssysteme vorgeschlagen worden, von denen heutzutage zwei ihre Anwendung finden: das molekulare Klassifizierungssystem nach Ambler (Ambler et al. 1991) und das funktionelle Klassifizierungssystem nach Bush, Jacoby und Medeiros (BJM) (Bush et al. 1995). Die Klassifizierung nach Ambler basiert auf Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz und unterscheidet zwischen den vier Klassen A bis D. Phänotypische Eigenschaften werden nicht berücksichtigt. Die Klassen A, C und D beinhalten ausschließlich Serin- β -Lactamasen. Die Metallo- β -Lactamasen sind in Klasse B zusammengefasst. Das BJM-Klassifizierungssystem basiert auf einer von Bush 1989 ausgearbeiteten Klassifizierung der β -Lactamasen nach deren Substratprofil und Verhalten gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren (z. B. Clavulansäure) (Bush 1989a; Bush 1989b). Die Einteilung erfolgt in vier Hauptgruppen (1-4) und diverse Untergruppen. In Gruppe 1 werden die Cephalosporinasen der Ambler Klasse C zusammengefasst, die Resistenz gegenüber allen β -Lactamen außer

Cefepim, Cefepim (Cephalosporine der 4. Generation) und Carbapenemen vermitteln, und zudem unempfindlich gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren sind. Die β -Lactamasen der Gruppe 2 hydrolysieren Penicilline und Cephalosporine in sehr unterschiedlichem Maße, sind aber, mit Ausnahme der Enzyme der Untergruppe 2br, durch Clavulansäure hemmbar. In den Untergruppen 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2e und 2f sind β -Lactamasen der Ambler Klasse A vertreten. Die β -Lactamasen der Ambler Klasse D werden als Untergruppe 2d klassifiziert. Die Metallo- β -Lactamasen der Ambler Klasse B hydrolysieren Carbapeneme, sind resistent gegenüber Clavulansäure und werden durch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) inhibiert. Sie sind in Gruppe 3 zusammengefasst. Gruppe 4 umfasst verschiedene weitere β -Lactamasen. Kommt es zu Veränderungen des Substratspektrums eines klassifizierten Enzyms aufgrund von Änderungen in der Aminosäuresequenz führt dies zu einer Zuordnung der Enzym-Variante in eine andere Gruppe bzw. Untergruppe. Das BJM-Klassifizierungssystem ist für die klinische Diagnostik von größerer Relevanz als das Ambler-System, da klinisch relevante β -Lactame und Inhibitoren berücksichtigt werden.

1.2. β -Lactamasen mit erweitertem Substratspektrum

Noch vor der Einteilung von Bush aus dem Jahr 1989 schlugen Richmond und Sykes 1973 eine Einteilung der β -Lactamasen vor und klassifizierten die weit verbreiteten klassischen TEM-1 und SHV-1 Enzyme als „ β -Lactamasen mit einem breiten Spektrum“ (*broad spectrum lactamases*) (Richmond und Sykes 1973). Anfang der Achtziger Jahre wurden die ersten Varianten dieser Enzyme mit Aktivität gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen nachgewiesen (SHV-2, TEM-3). 1987 wurde der Begriff „ β -Lactamase mit einem erweitertem breiten Spektrum“ (*extended-broad-spectrum beta lactamase*) geprägt und ab 1989 in „ β -Lactamase mit einem erweitertem Spektrum“ (*extended-spectrum beta lactamase* - ESBL) abgekürzt (Jarlier et al. 1988; Philippon et al. 1989). ESBLs wurden in die BJM-Gruppe 2be eingeteilt, die definiert sind als β -Lactamasen, die Oxyimino-Cephalosporine hydrolysieren (mit mindestens 10 % der Aktivität gegenüber Benzylpenicillin) und durch Clavulansäure hemmbar sind. Die Einteilung in Gruppe 2be verdeutlicht auch die Ableitung der ESBLs von Ausgangsenzymen mit breitem Wirkungsspektrum (Gruppe 2b). Damit wurde diese ursprüngliche ESBL-Definition vor allem TEM- und SHV-Varianten gerecht, die aufgrund von Punktmutationen und den daraus resultierenden Aminosäureaustauschen ein erweitertes katalytisches Spektrum zeigten.

Aufgrund der immer größer werdenden Zahl an β -Lactamasen, die (I) ein ähnliches Substrat- und Inhibitorprofil wie die TEM- und SHV-ESBLs zeigen, aber keinen evolutionäre Verbindung zu diesen Gruppen besitzen (z. B. CTX-M β -Lactamasen), (II) zwar das 10 % Hydrolysekriterium für Oxyimino-Cephalosporine nicht erfüllen, aber trotzdem Resistenz vermitteln können (z. B. TEM-12), (III) der Ambler Klasse C oder D angehören und nicht so stark durch Clavulansäure gehemmt werden, aber Mutationen besitzen, die das Substratspektrum eines Ausgangsenzyms erweitern (z. B. OXA-15, AmpC) oder (IV) zusätzlich Carbapenemase-Aktivität besitzen (z. B. GES), wurde zuletzt eine pragmatischere Definition diskutiert. Folgende Definition wurde vorgeschlagen: Eine ESBL ist jede, meist erworbene β -Lactamase, die in der Lage ist, Oxyimino-Cephalosporine (aber nicht Carbapeneme) zu hydrolysieren oder Resistenz gegen diese zu vermitteln, oder jede Variante einer β -Lactamasefamilie, die ein erhöhtes Vermögen besitzt dies zu tun (Livermore 2008). Diese Definition verlangt eine genauere Bezeichnung der ESBL-Klasse, wie „TEM-ESBL“, „SHV-ESBL“, „CTX-M-ESBL“, „OXA-ESBL“ oder „*extended-spectrum AmpC*“. Enzyme mit Carbapenemase-Aktivität werden nicht von dieser Definition abgedeckt. ESBLs sind inzwischen zu einem bedeutenden Problem im Gesundheitsbereich geworden und spielen eine große Rolle bei der Abwägung der Therapie und bei Aspekten der Krankenhaushygiene und Infektionskontrolle. Giske und Kollegen haben daher kürzlich eine neue Klassifikation vorgeschlagen, die die strenge, komplexe wissenschaftliche Definition für ESBLs auflockert und vor allem darauf abzielt, Klinikpersonal und Angestellten im Gesundheitswesen einen sicheren Umgang mit β -Lactamasen mit breitem Wirkspektrum zu

ermöglichen (Giske et al. 2009). Dafür wurden die Begriffe ESBL_A für Klasse A β -Lactamasen, ESBL_M für verschiedene Klasse C und D β -Lactamasen und ESBL_{CARBA} für β -Lactamasen mit Carbapenemase-Aktivität eingeführt.

1.2.1 TEM und SHV β -Lactamasen

Bei ESBLs des TEM- und SHV-Typs handelt es sich um Ambler Klasse A Enzyme, die die Definition der BJM Gruppe 2be prägten und sich aus den inzwischen ubiquitär verbreiteten und auf übertragbaren Plasmiden codierten TEM-1, TEM-2 und SHV-1 β -Lactamasen entwickelten. Die Herkunft der mobilen *bla*_{TEM}-Gene ist noch nicht geklärt. Die *bla*_{SHV}-Gene sind Nachkommen des chromosomalen *bla*_{SHV}-Gens von *K. pneumoniae* (Ford und Avison 2004). ESBLs sind weit verbreitet in Enterobakterien, speziell *E. coli* und *Klebsiella spp.*, wurden aber auch in vielen weiteren Spezies wie z. B. *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen (Paterson und Bonomo 2005).

Die Evolution der parentalen *bla*_{TEM}- und *bla*_{SHV}-Gene zu ESBLs basiert auf Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen, welche das Substratspektrum vor allem gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen erweitern (Gniadkowski 2008). Allgemein vermitteln TEM- und SHV-ESBLs Resistenzen gegenüber Penicillinen, Erst-, Zweit- und Drittgenerations-Cephalosporinen (mit Ausnahme der Cephamycine) und Aztreonam. Sie können in der Regel keine Carbapeneme spalten und sind empfindlich gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren. Aktuell sind über 160 TEM und über 110 SHV-Varianten beschrieben worden (www.lahey.org/studies/). Unter den zahlreichen Substitutionen, die für TEM- und SHV- β -Lactamasen bekannt sind (www.lahey.org/studies/), werden Austausche an folgenden Positionen mit einer Substraterweiterung in Verbindung gebracht: TEM: Glu104, Arg 164, Asp179, Ala237, Gly238 und Glu240; SHV: Ala146, Gly156, Leu169, Asp179, Arg205, Gly238 und Glu240. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt dabei nach Ambler (Ambler et al. 1991). Von besonderer Bedeutung sind Gly238Ser/Ala (TEM und SHV), Arg164Ser/His/Cys (TEM) und Asp179Gly/Ala/Asn (SHV), die große Auswirkungen auf die Struktur des Enzyms haben und dadurch die Aktivität gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen vergrößern (Cantu, III und Palzkill 1998; Delmas et al. 2005; Knox 1995). Die Substitutionen Glu204Lys (TEM und SHV) und Glu104Lys (TEM) verbessern die Interaktion des Enzyms mit den negativ geladenen Seitenketten von Ceftazidim und Aztreonam. Eine Änderung der Aminosäure an Position 237 von Alanin zu Threonin (TEM) wird mit einer besseren Interaktion mit z. B. Cefotaxim in Verbindung gebracht (Knox 1995). Einen tieferen Einblick in die Evolution der TEM- und SHV- β -Lactamasen bietet der Übersichtsartikel von Gniadkowski (Gniadkowski 2008).

In den Neunziger Jahren wurden zunächst in *E. coli*-Isolaten aus Urin plasmidkodierte TEM-Varianten nachgewiesen, die im Gegensatz zu TEM-1 und dessen ESBL-Derivaten nicht durch β -Lactamase-Inhibitoren gehemmt wurden (Chaibi et al. 1999; Thomson und Amyes 1992). Diese wurden als „*inhibitor resistant* TEM (IRT) β -Lactamasen“ bezeichnet und in eine neue BJM-Gruppe 2br eingeteilt. IRTs vermitteln normalerweise Resistenz gegenüber Ampicillin/Sulbactam- oder Amoxicillin/Clavulansäure-Kombinationen, nicht jedoch gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen (inklusive Cephamycine), Carbapenemen und Piperacillin/Tazobactam-Kombinationen. Sie besitzen meist Mutationen (einzeln oder in Kombination), die zu Aminosäureaustauschen an Positionen führen, welche nachweislich Einfluss auf die Interaktion des Inhibitors mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum (Ser130) haben, wie z. B.: Met69, Arg244, Arg275, Asn276 oder Ser130 selbst (Chaibi et al. 1999; Wang et al. 2002b). Aktuell sind über 20 IRTs bekannt. Ein weiterer interessanter Aspekt der Evolution der TEM-Enzyme sind die so genannten „*complex mutant* TEM (CMT) β -Lactamasen“. Diese besitzen gleichzeitig Mutationen in *bla*_{TEM}, welche für ESBL- und IRT-Varianten beschrieben wurden (Neuwirth et al. 2001; Robin et al. 2005; Sirot et al. 1997), zeigen also gleichzeitig veränderte Aktivitäten gegenüber Cephalosporinen mit breitem

Wirkenspektrum und β -Lactamase-Inhibitoren. Eine vollständige Kombination beider Aktivitäten scheint jedoch nicht möglich, so dass sich verschiedene CMT-Varianten oft sehr unterschiedlich gegenüber beiden Substanzklassen verhalten. So vermittelte TEM-125, welche Mutationen besitzt, die für TEM-12 (ESBL) und TEM-39 (IRT) beschrieben wurden, zwar ein hohes Maß an Resistenz gegenüber Ceftazidim, nicht jedoch gegenüber Cefotaxim oder Penicillin/Clavulansäure-Kombinationen (Robin et al. 2006). Aktuell wurden ca. 9 CMTs beschrieben (Canton et al. 2008a; Robin et al. 2007).

Es sind nur wenige SHV β -Lactamasen des IRT- oder CMT-Types bekannt. So zeigten sich Isolate, die SHV-10 oder SHV-49 produzierten, zwar Inhibitor-resistent, aber nicht resistent gegenüber Cephalosporinen mit breitem Wirkenspektrum (trotz entsprechender Mutationen) (Dubois et al. 2004; Prinarakis et al. 1997). Der Nachweis von IRT- und CMT-Enzymen in klinischen Isolaten mit phänotypischen Methoden stellt die medizinische Mikrobiologie vor große Probleme, da aufgrund der komplexeren Substratspektren klassische Definitionen durchbrochen werden (siehe 1.5.1). Eine endgültige Bestätigung kann daher nur mit Hilfe von molekularen Methoden erbracht werden. Nicht für alle bekannten Mutationen ist ein direkter Zusammenhang mit einer ESBL-, IRT- oder CMT-Charakteristik nachgewiesen worden. Diese Positionen scheinen daher aus klinischer Sicht zunächst nicht relevant zu sein. Eine Modulation des Substratspektrums in Kombination mit weiteren Mutationen oder gegenüber zukünftigen β -Lactamen kann aber nicht ausgeschlossen werden. Aus epidemiologischer Sicht ist eine vollständige Identifikation unerlässlich.

1.2.2 CTX-M β -Lactamasen

Neben den klassischen TEM- und SHV-ESBLs gibt es eine Reihe weiterer erworbener ESBLs. Die Familie der CTX-M- β -Lactamasen ist dabei die am weitesten verbreitete. Die klinische Relevanz dieser Enzyme ist in Europa inzwischen sogar höher einzuschätzen als die der TEM- und SHV-ESBLs (Rossolini et al. 2008). Die erste Variante (CTX-M-1) wurde 1989 in einem klinischen *E. coli*-Isolat nachgewiesen (Bauernfeind et al. 1990). Aktuell sind über 40 bla_{CTX-M} -Allele bekannt, die phylogenetisch meist in fünf Gruppen eingeteilt werden: CTX-M1-, CTX-M2-, CTX-M8-, CTX-M9- und CTX-M25-Gruppe. Die verschiedenen bla_{CTX-M} -Gengruppen wurden vermutlich durch mehrere unabhängige Ereignisse mobilisiert und stammen von chromosomalen bla -Genen der Gattung *Klyvera* ab (Bonnet 2004; Humeniuk et al. 2002; Olson et al. 2005; Poirel et al. 2002b; Rodriguez et al. 2004). Die CTX-M- β -Lactamasen sind ebenfalls Ambler Klasse A Enzyme und zeichnen sich durch eine hohe katalytische Aktivität gegenüber Penicillinen und den Cephalosporinen Cefotaxim und Ceftriaxon aus. Ceftazidim wird normalerweise schlecht hydrolysiert, so dass CTX-M-produzierende Isolate oft sensibel erscheinen, wenn ihre Empfindlichkeit gegenüber diesem Antibiotikum getestet wird (Rossolini et al. 2008). Beim phänotypischen Nachweis muss dieser Umstand berücksichtigt werden. Die verschiedenen CTX-M-Enzyme unterscheiden sich innerhalb der fünf Gruppen nur durch wenige Aminosäureaustausche. Eine Modulation des Substratspektrums durch bestimmte Polymorphismen ist daher analog zu den TEM- und SHV-ESBLs möglich. CTX-M-Varianten die die Substitutionen Asp240Gly (CTX-M-15 und CTX-M-16) oder Pro167Ser (CTX-M-19) besitzen zeichnen sich durch erhöhte Hydrolyseraten gegenüber Ceftazidim aus (Bae et al. 2006; Cartelle et al. 2004; Kimura et al. 2004). Dies spiegelt sich auch in den Empfindlichkeiten der entsprechenden Isolate wieder. Bei Pro167Ser kommt es jedoch zur gleichzeitigen Verringerung der Aktivität gegenüber anderen Substraten. CTX-M-Varianten des IRT-Types sind nicht bekannt (Canton et al. 2008a).

1.2.3 Seltene ESBLs

Neben den TEM-, SHV-, und CTX-M-Lactamasen gibt es eine Reihe von weiteren plasmidkodierten β -Lactamase-Familien, deren Vertreter als seltene ESBLs bezeichnet

werden. Beispiele sind β -Lactamasen der SFO-, BES-, BEL-, TLA-, GES-, PER- und VEB-Familien. Bei Enzymen der PER-, VEM- und GES-Familien zeichnet sich jedoch ein Anstieg der Prävalenz ab (Naas et al. 2008). Die Nomenklatur der verschiedenen β -Lactamasen und β -Lactamasen-Familien folgt keiner genauen Systematik. So erfolgte die Benennung z. B. nach bevorzugtem Substrat (Cefotaxim, CTX-M; Oxacillin, OXA), β -Lactamase-Typ (Ambler-Class-C, ACC), Isolationsort (Dharan Hospital, DHA) oder Namen des Patienten (Temoniera, TEM) (Jacoby 2006).

1.2.4 Epidemiologie

Die erste plasmidkodierte β -Lactamase mit Aktivität gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen wurde 1983 in Deutschland nachgewiesen (Knothe et al. 1983). Dabei handelte es sich um eine Variante des klassischen SHV-1 Enzymes mit einem einzelnen Aminosäureaustausch, welche später als SHV-2 bezeichnet wurde. Kurze Zeit später wurden in *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten französischer Krankenhäuser β -Lactamasen mit erweitertem Substratspektrum des TEM-Types nachgewiesen, welche von 1985 an eine Reihe von schweren Ausbrüchen übertragbarer Cefotaxim- und Ceftazidim-Resistenz verursachten (Brun-Buisson et al. 1987; Sirot et al. 1987a; Sirot et al. 1987b). Weitere nosokomiale Ausbrüche, die meist auf ESBL-produzierende *Klebsiella pneumoniae*-Isolate zurückzuführen waren, wurden seither weltweit beschrieben (Gniadkowski et al. 1998; Meyer et al. 1993; Szabo et al. 1999; Urban et al. 1994; Vatopoulos et al. 1990).

Bis Ende der Neunziger Jahre galt für die Epidemiologie von ESBLs in Europa, dass erstens fast alle nachgewiesenen ESBLs β -Lactamasen des TEM- oder SHV-Types waren, während CTX-M-ESBLs nur selten detektiert wurden. Zweitens waren Isolate, die diese Enzyme produzierten meist mit nosokomialen Ausbrüchen auf Intensivstationen und nur selten mit ambulant erworbenen Infektionen assoziiert. Drittens war die Prävalenz von ESBL-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten größer als von *E. coli*-Isolaten. Europäische Studien von 1994 bzw. 1997 - 98 beobachteten Resistenzraten von 23 - 25 % bei *Klebsiella spp.*-Isolaten von Intensivstationen (Babini und Livermore 2000; Livermore und Yuan 1996). Die Situation hat sich im 21. Jahrhundert jedoch dramatisch verändert: CTX-M Enzyme haben TEM- und SHV- β -Lactamasen in vielen europäischen Ländern als vorherrschende ESBL-Spezies abgelöst. Außerdem stammt die Mehrzahl CTX-M-ESBL produzierender Isolate von ambulanten Patienten oder aus anderen Krankenhausbereichen als den Intensivstationen. Zudem werden CTX-M-ESBLs oft von *E. coli*-Isolaten produziert. *E. coli* wurde dadurch, neben *K. pneumoniae*, zum bedeutendsten Wirt (Canton et al. 2008b; Livermore et al. 2007). Da CTX-M-ESBLs inzwischen auch in Lateinamerika und Asien überwiegen, sind TEM- und SHV-ESBLs nur noch in Nordamerika vorherrschend (Bush 2008).

Multinationale Programme zur Überwachung der Resistenzsituation in Europa und anderer Kontinente haben einen signifikanten Anstieg der Ver- und Ausbreitung von ESBL-produzierenden Isolaten festgestellt, wobei die Resistenzraten je nach betrachteter Region, Spezies oder Herkunft der Isolate stark variierten (Coque et al. 2008). Im Rahmen des SENTRY Programms wurde unter Anderem die Verbreitung von ESBL-produzierenden *E. coli*-, *K. pneumoniae*-, *P. mirabilis*- und *Salmonella spp.*-Isolaten in Nordamerika (USA, Kanada), Europa, Lateinamerika und Asien im Zeitraum 1997 bis 1999 verglichen (Winokur et al. 2001). Die Prävalenzen für *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolate waren in Europa größer als in Nordamerika, jedoch niedriger als in Lateinamerika und Asien. Dieser Trend wurde im Rahmen des TEST (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) Programms für den Zeitraum 2004 bis 2006 bestätigt (Reinert et al. 2007). Aktuelle EARSS-Daten (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System* 2008) spiegeln den Anstieg der Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz bei *E. coli* und *K. pneumoniae* wieder (Abbildung 1-1). Im Zeitraum zwischen 2001 und 2007 kam es zu einem Anstieg bei *E. coli* in 23 der 29 teilnehmenden Länder. Weniger als die Hälfte der Länder (13 von 31) meldeten 2007 noch Resistenzraten von unter 5 %, drei Länder sogar Raten von über 20 % (Bulgarien: 23 %, 23

Rumänien: 28 % und Türkei: 40 %). Empfindlichkeitsdaten für *K. pneumoniae*-Isolate wurden erst ab 2005 umfassend gesammelt. Die Resistenzraten variierten sehr stark zwischen den 29 teilnehmenden Ländern. Nur 10 Länder berichteten Resistenzraten < 10 %, acht Länder Raten von 40 % oder größer (Kroatien: 40 %, Israel: 44 %, Lettland: 44 %, Türkei: 44 %, Tschechische Republik: 46 %, Bulgarien: 55 %, Griechenland: 62 % und Rumänien: 80 %). Die EARSS-Datenbank enthält keine Angaben über den Mechanismus der beobachteten Cephalosporin-Resistenz.

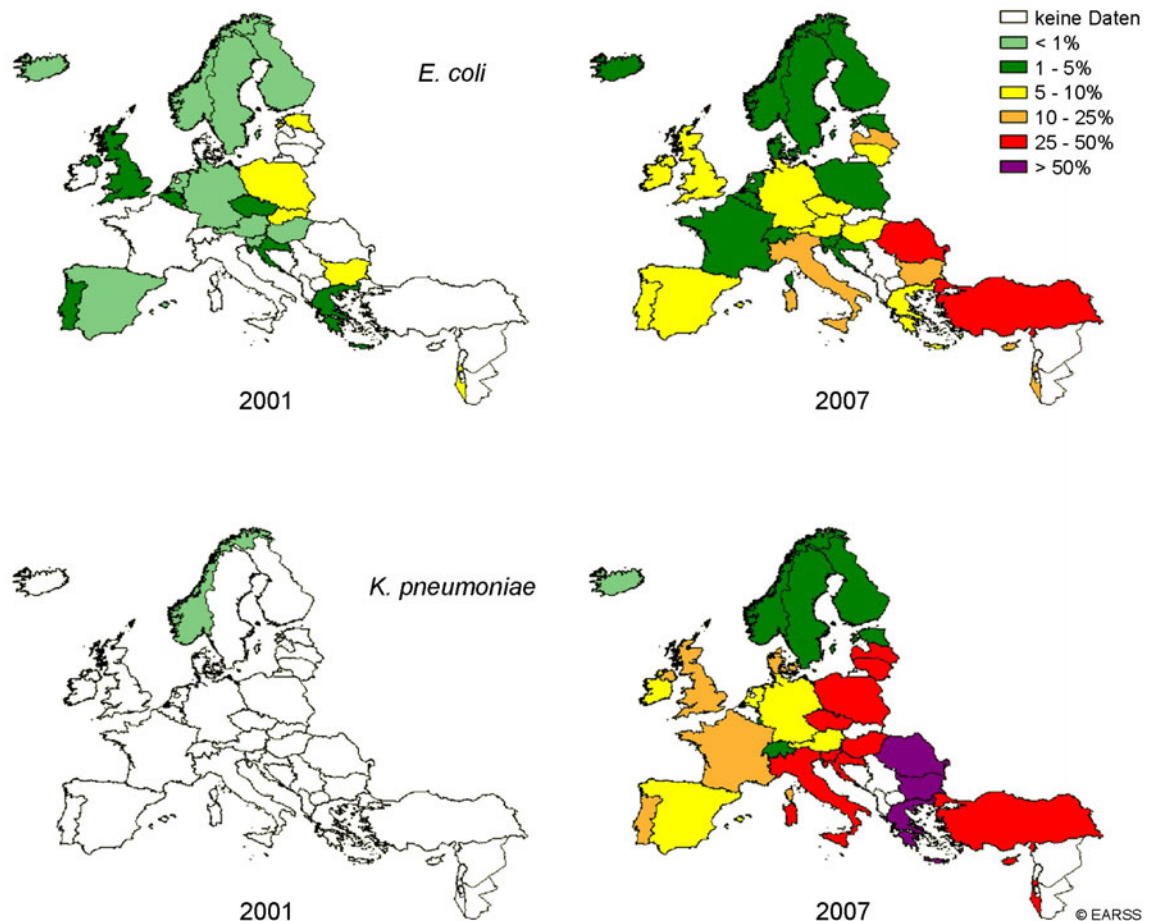


Abbildung 1-1: Anteil der *E. coli*- bzw. *K. pneumoniae*-Isolate mit Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz. Daten erhoben in den teilnehmenden Ländern des European Antimicrobial Resistance Surveillance System – EARSS in den Jahren 2001 und 2007. (www.rivm.nl/earss/database/).

Das MYSTIC Überwachungsprogramm (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) kommt für Europa im Zeitraum von 1997 bis 2004 zu ähnlichen Ergebnissen: Der Anteil an ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten stieg von 2,1 auf 10,8 %, der von *K. pneumoniae*-Isolaten von 9,0 auf 13,6 %. Aber auch für andere Enterobakterien wie *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* und *Proteus mirabilis* wurden Zunahmen der Resistenzraten beobachtet. Interessanterweise beobachtete MYSTIC für die USA im gleichen Zeitraum niedrigere Prävalenzen als in Europa und eine Verringerung des Anteils ESBL-produzierender *E. coli*-Isolate von 5,1 auf 1,4 % bzw. *K. pneumoniae*-Isolate von 7,2 auf 4,4 % (Goossens und Grabein 2005). Eine Studie der Paul Ehrlich Gesellschaft (PEG) aus dem Jahr 2007, die die Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland, Österreich und der Schweiz untersuchte, beobachtete eine starke Zunahme der Resistenz gegen breit wirksame Cephalosporine und Fluorchinolone bei *E. coli* und anderen klinisch wichtigen Enterobakterien (*E. cloacae*,

K. pneumoniae). Im Vergleich zu 2004 stieg der Anteil an *E. coli*-Isolaten mit einem ESBL-Phänotyp von 5,1 auf 10,3 %, der Anteil an *K. pneumoniae*-Isolaten von 7,3 auf ebenfalls 10,3 %. Die Resistenzraten bei *K. oxytoca* und *P. mirabilis* waren konstant bzw. leicht rückläufig (Kresken et al. 2009). Eine Zunahme der Prävalenz ESBL-produzierenden Isolate wurde auch in nationalen Studien beobachtet, z. B. in Spanien, Italien, Belgien, Polen und Ungarn (Damjanova et al. 2008; Empel et al. 2008; Luzzaro et al. 2006; Reinert et al. 2007; Rodriguez-Villalobos et al. 2005; Romero et al. 2005).

Für die Diversität der ESBLs in Europa gilt: Unter den TEM- β -Lactamasen sind TEM-24, TEM-3, TEM-4 und TEM-52 weit verbreitet (Canton et al. 2008b). Die häufigste SHV- β -Lactamase ist SHV-12. SHV-5 und SHV-2 sind in den osteuropäischen Ländern verbreitet (Coque et al. 2008). Die Situation innerhalb der CTX-M-Familie ist komplex. Die häufigsten Enzyme der CTX-M9-Gruppe sind CTX-M-9 und CTX-M-14. Sie spielen in Spanien, Portugal, Frankreich und dem Vereinigten Königreich eine Rolle. In den meisten europäischen Ländern ist jedoch CTX-M-15 als Variante der CTX-M1-Gruppe vorherrschend (Livermore et al. 2007). Des Weiteren spielen CTX-M-3 und CTX-M-32 eine Rolle. Varianten der CTX-M2-Gruppe sind im Gegensatz zu Südamerika oder Asien in Europa sehr ungleichmäßig verbreitet (Canton et al. 2008b), und Vertreter der Gruppen CTX-M8 und CTX-M25 wurden nur im Vereinigten Königreich nachgewiesen (Hopkins et al. 2006; Munday et al. 2004). Die erfolgreiche Ausbreitung von CTX-M-15 wurde mit spezifischen Klonen (z. B. B2-*E. coli* O25:H4-ST131 oder *K. pneumoniae*-ST11, -ST15 und -ST147) assoziiert, aber auch mit dem Transfer von endemischen Plasmiden, die das *bla*_{CTX-M-15}-Gen tragen (Damjanova et al. 2008; Lau et al. 2008; Novais et al. 2007).

1.3. AmpC- β -Lactamasen

Die AmpC-Enzyme sind β -Lactamasen der Ambler Klasse C und werden auch als Cephalosporinasen bezeichnet (Ambler et al. 1991). Ihre Einteilung in die BJM-Gruppe 1 basiert auf der Hydrolyse aller β -Lactame außer Cephalosporinen der 4. Generation (z. B. Cefepim oder Cefepirom) und Carbapenemen. AmpC- β -Lactamasen sind unempfindlich gegenüber handelsüblichen β -Lactamase-Inhibitoren (Bush et al. 1995). Sie unterscheiden sich daher von den ESBLs der Klasse A durch ihre Aktivität gegenüber 7- α -Methoxy-Cephalosporinen (Cephamycine wie z. B. Cefoxitin oder Cefotetan) und ihrem Verhalten gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren. Viele Enterobakterien besitzen ein chromosomal codiertes *ampC*-Gen, welches entweder nur schwach konstitutiv exprimiert wird (z. B. *E. coli* oder *Shigella* spp.) oder durch β -Lactam-Antibiotika induziert werden kann (z. B. *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* oder *Enterobacter* spp.) (Wiegand 2003). Aufgrund ihrer Lokalisation spielten diese *ampC*-Gene ursprünglich keine Rolle bei der schnellen Verbreitung von Resistenzgenen durch horizontalen Gentransfer, wie es eine Lokalisation auf Plasmiden erlaubt (Barlow und Hall 2002). Mittlerweile wurden jedoch eine Reihe plasmidkodierter *ampC*-Gene nachgewiesen, die in der Regel von einem starken Promoter konstitutiv exprimiert werden und klinische Resistenz bei Spezies vermitteln, die normalerweise keine β -Lactamasen dieses Typs produzieren (z. B. *Klebsiella* spp., *Salomonella* spp.) oder ihre eigenes *ampC*-Gen nur schwach exprimieren, wie z. B. *E. coli* (Hanson 2003). Voraussetzung für die Vermittlung von Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen wie z. B. Ceftazidim oder Cefotaxim, ist eine Produktion der AmpC- β -Lactamase in großer Menge.

1.3.1 Chromosomal codierte AmpC- β -Lactamasen

E. coli und *Shigella* spp. besitzen nicht induzierbare chromosomale *ampC*-Gene. Das *ampC*-Gen von *E. coli* wird aufgrund eines schwachen Promotors und einer Attenuator-Struktur nur schwach exprimiert (Caroff et al. 2000). Es kann jedoch zu einer Überproduktion des AmpC-Enzyms kommen durch (I) Gen-Duplikation, (II) Mutationen, die zu einem starken Promotor

führen, oder (III) Mutationen, die die Attenuation des *ampC*-Gens beeinflussen. Mutationen im Promotorbereich spielen hierbei die größte Rolle, da sich eine Gen-Duplikation und Mutationen im Attenuatorbereich nur moderat auf die Produktion der AmpC- β -Lactamase auswirken (Normark et al. 1977; Tracz et al. 2007). Innerhalb der Promotor-Region des *ampC*-Gens sind eine Reihe von Mutationen bekannt, die zu veränderten -35- oder -10-Boxen, einem größeren Abstand dieser Regionen (17 bzw. 18 statt 16 bp) oder zu einer Verschiebung des Promotorbereichs aufgrund der Bildung alternativer -35- und -10-Boxen, führen können (Mulvey et al. 2005). Durch die Änderungen wird der Promotor dem *E. coli* Konsensus-Promotors ähnlicher, wobei die Sequenz der -35-Box und ihr Abstand zur -10-Box den größten Effekt auf die Transkription haben. Die Stärke des Promotors scheint jedoch nicht direkt mit den beobachteten MHK-Werten für Cefoxitin verschiedener *E. coli*-Stämme zu korrelieren, so dass der Einfluss weiterer Stamm-spezifischer Faktoren diskutiert wird (Haldorsen et al. 2008; Tracz et al. 2007). In jüngster Zeit wurden zusätzlich Mutationen im chromosomalen *ampC*-Gen beschrieben, die zu einer Erweiterung des Substratspektrums der *E. coli*-AmpC- β -Lactamase führen (*extended spectrum* AmpC) (Mammeri et al. 2006; Nordmann und Mammeri 2007).

Bei induzierbaren chromosomalen Genen, wie z. B. von *Enterobacter spp.* oder *C. freundii*, reicht selbst die Induktion des *ampC*-Gens meist nicht aus, um klinische Resistenz zu vermitteln. Bei diesen Spezies kann es jedoch zu Mutationen in Genen kommen, die wichtige Rollen im Regulationsmechanismus des *ampC*-Gens übernehmen (*ampD*, *ampR*) (Wiegand 2003). Die Expression der β -Lactamase ist dann dereprimiert, und es findet eine konstitutive Hyperproduktion statt. Während wenige spezifische Mutationen die Funktion des Transkriptionsfaktors AmpR beeinflussen können, führen eine Vielzahl unspezifischer Mutationen zu einem Funktionsverlust von AmpD (Bagge et al. 2002; Kopp et al. 1993; Kuga et al. 2000; Petrosino et al. 2002; Reisbig et al. 2003; Wiegand 2003). Die Mutationsrate, die zu einer Dereprimierung führt, ist daher hoch und ebenfalls das Risiko, dass während der Therapie einer *Enterobacter*- oder *Citrobacter*-Infektion auf dereprimierte Mutanten selektiert wird. Laut einer PEG-Studie aus dem Jahre 2007 betrug der Anteil an *C. freundii*-, *E. cloacae*- und *M. organii*-Isolaten, die resistent gegenüber Cefotaxim, Ceftazidim und Ceftriaxon waren, in Deutschland zwischen 50 % und 60 % (Kresken et al. 2009).

1.3.2 Plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen

Die erste plasmidkodierte AmpC- β -Lactamase wurde 1989 in einem *K. pneumoniae*-Isolat aus Südkorea beschrieben und aufgrund der vermittelten Resistenz gegenüber Cephamycinen CMY-1 genannt (Bauernfeind et al. 1989). In den folgenden Jahren wurden plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen weltweit und häufig in *K. pneumoniae* beschrieben (Philippon et al. 2002). Weitere Spezies mit klinischer Relevanz bezüglich dieser Enzyme sind *E. coli*, *P. mirabilis* und *Salmonella* (Doi und Paterson 2007). Die Nomenklatur der plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen erfolgte willkürlich nach bevorzugtem Substrat (Cefoxitin, FOX; Cephamycine, CMY; Latamoxef, LAT), β -Lactamase-Typ (Ambler-Class-C, ACC; AmpC-Type, ACT), Isolationsort (Miriam Hospital, MIR; Dharan Hospital, DHA) oder Namen des Patienten (Bilal, BIL) (Jacoby 2006). Nach der Korrektur einiger *ampC*-Gensequenzen ergaben sich Redundanzen in der Benennung. So wurde z. B. CMY-2 zunächst als BIL-1 oder LAT-2 beschrieben. Phylogenetisch stammen die plasmidkodierten *ampC*-Gene von chromosomalen Genen gramnegativer Organismen, u. a. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* oder *Aeromonas sp.* ab. Sie werden auf der Basis ihrer Aminosäuresequenzen in 6 Gruppen eingeteilt: *Citrobacter freundii*-Gruppe (CIT), *Hafnia alvei*-Gruppe (ACC), *Aeromonas sobria*-Gruppe (FOX), *Enterobacter*-Gruppe (ENT), *Morganella morganii*-Gruppe (DHA) und *Aeromonas*-Gruppe (AER) (Barlow und Hall 2002). Die Homologie der plasmidischen Vertreter zu ihrem mutmaßlichen chromosomalen Ursprungsgen beträgt zwischen 100 % (DHA-1 vs. *Morganella morganii-ampC*) und 74 % (FOX-Enzyme vs. *Aeromonas sobria-ampCs*). Die Ähnlichkeit der plasmidkodierten *ampC*-Gene innerhalb einer Gruppe liegt meist über 90 %. Die verschiedenen *ampC*-Gene haben

sich nach ihrer Mobilisation deutlich verändert. Dabei kam es jedoch im Gegensatz zur Evolution der TEM- oder SHV- β -Lactamasen zu keiner Ausweitung des Substratspektrums, was laut Barlow und Hall einerseits in einem bereits breiten Spektrum und andererseits einem geringen Selektionsdruck der relativ neuen Cephalosporine der 4. Generation (z. B. Cefepim) begründet sein könnte (Barlow und Hall 2002). Allerdings wurde mit CMY-19 eine AmpC- β -Lactamase der *Aeromonas*-Gruppe in einem *K. pneumoniae*-Isolat nachgewiesen, die sich durch den Aminosäureaustausch Ile292Ser von CMY-9 unterscheidet und einen vergleichbar hohen MHK-Wert (4 μ g/ml) gegenüber Cefepim vermittelte (Wachino et al. 2006). Mit Ausnahme der *ampC*_{DHA}-Gene, sind die plasmidkodierte *ampC*-Gene nicht induzierbar und werden konstitutiv exprimiert. Somit vermitteln die entsprechenden Plasmide durch ihre Anwesenheit meist auch klinische Resistenz gegenüber Penicillinen, Oxyimino-Cephalosporinen, Cephamycinen und Aztreonam. Eine Ausnahme sind Enzyme des AAC-Typs, die Cephamycine nur schlecht hydrolysieren. Die meisten AmpC-produzierenden Organismen zeigen höhere MHK-Werte gegenüber Ceftazidim, als gegenüber Cefotaxim und Resistenz gegenüber β -Lactam/Inhibitor-Kombinationen. Im Gegensatz zu den ESBLs gibt es für AmpC- β -Lactamasen keine standardisierten Nachweis-Methoden (siehe 1.5.1) (Doi und Paterson 2007). Infolgedessen existieren nur wenige Daten zur Prävalenz plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen. Die weltweit am häufigsten nachgewiesene plasmidkodierte AmpC- β -Lactamase ist CMY-2 (Adler et al. 2008; Alvarez et al. 2004; Mammeri et al. 2008; Philippon et al. 2002). In zwei amerikanischen Studien wurden immerhin in 8,5 - 11 % der getesteten Ceftazidim-resistenten *K. pneumoniae*-Isolate plasmidkodierte AmpC- β -Lactamasen nachgewiesen (Alvarez et al. 2004; Moland et al. 2002).

1.4. Oxacillinasen (OXA)

Die Oxacillinasen (OXA) sind β -Lactamasen der Ambler Klasse D (Ambler et al. 1991). Ihr Name und ihre Einteilung in die BJM-Gruppe 2d (Bush et al. 1995) basiert auf Hydrolyseraten für Cloxacillin und Oxacillin von mehr als 50 % der Hydrolyserate für Benzylpenicillin. Gruppe 2d Enzyme werden nicht so stark durch Clavulansäure gehemmt wie die übrigen β -Lactamasen der Gruppe 2. In der sehr heterogenen Gruppe der OXA- β -Lactamasen weisen viele der Enzyme zueinander nur eine Aminosäureidentität von 20 bis 30 % auf. OXA-Varianten können, basierend auf den Einteilungen von Sanschagrín (Sanschagrín et al. 1995) bzw. Naas und Kollegen (Naas und Nordmann 1999), in verschiedene Gruppen und Untergruppen klassifiziert werden, wobei die Verwandtschaften innerhalb der Gruppen variieren. Die meisten *bla*_{OXA}-Gene liegen auf großen transferierbaren Plasmiden. Dort sind sie meist in Genkassetten in der variablen Region von Klasse-1-Integrans lokalisiert, welche auch in Transposonstrukturen zu finden sind (Naas und Nordmann 1999). Dies erklärt die häufige Assoziation der *bla*_{OXA}-Gene mit weiteren Resistenzgenen (z. B. Aminoglykosid-modifizierende Enzyme) und könnte die schnelle Verbreitung der Oxacillinasen über verschiedene bakterielle Spezies hinweg erleichtern. Neben den plasmidkodierten Oxacillinasen gibt es auch eine Reihe von OXA-Varianten, die chromosomal lokalisiert sind. Obwohl OXA- β -Lactamasen überwiegend in *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* vorkommen, wurden sie auch in anderen gramnegativen Bakterien, einschließlich Enterobakterien wie *E. coli*, *K. pneumoniae*, und *Salmonella spp.*, nachgewiesen (Livermore 1995; Mulvey et al. 2004; Poirel et al. 2004; Sanschagrín et al. 1995). Im Allgemeinen zeigen die Oxacillinasen ein enges hydrolytisches Spektrum gemäß der Definition für die Gruppe 2d und eine nicht signifikante Hydrolyserate für Cephalosporine der 3. Generation. Einige Varianten dieser Enzymklasse zeigen jedoch ein erweitertes Substratspektrum bzw. Carbapenemase-Aktivität.

1.4.1 OXA-Enzyme mit erweitertem Substratspektrum

Obwohl sich die Definition für ESBLs, also eine Erweiterung des Resistenz-Spektrums aufgrund von Punktmutationen, oft auf Enzymgruppen der Ambler Klasse A (siehe TEM, SHV) beschränkt, gibt es Argumente für die Aufnahme einiger β -Lactamasen des OXA-Typs (Klasse D) in diese Familie (Livermore 2008). OXA-Enzyme mit erweitertem Substratspektrum (OXA-ESBL oder ES-OXA) findet man hauptsächlich in den Gruppen I und II. Die meisten OXA-ESBLs stammen von OXA-10 (OXA-11, OXA-14, OXA-16 und OXA-17), OXA-13 (OXA-19 und OXA-28) und OXA-2 (OXA-15 und OXA-32) ab. In diesen Fällen vermitteln einzelne Aminosäureaustausche eine breitere Resistenz gegenüber Cefotaxim, Ceftriaxon und teilweise Aztreonam als die jeweiligen parentalen Enzyme (Naas und Nordmann 1999). Diese Entwicklung von parentalen Enzymen mit einem schmalen Spektrum zu einem erweiterten Spektrum, zeigt einige Parallelen zur Evolution der TEM- und SHV-ESBLs. Die von OXA-10 abgeleiteten Varianten besitzen einen Austausch von Glycin zu Aspartat an Position 167 (Nummerierung nach Couture) (Couture et al. 1992). Diese Substitution wird mit einer erhöhten Hydrolyse von Cefprozid assoziiert (Naas und Nordmann 1999). Weitere Varianten mit erweitertem Spektrum sind OXA-18 und OXA-45, für die kein verwandtes parentales Gen bekannt ist, und die im Gegensatz zu den meisten OXA-Enzymen durch Clavulansäure gehemmt werden (Philippon et al. 1997; Toleman et al. 2003). Sie werden aktuell der sehr heterogenen Gruppe IV zugeordnet. Ursprünglich wurden OXA-ESBLs in *P. aeruginosa* entdeckt (Hall et al. 1993; Philippon et al. 1997; Poirel et al. 2001; Poirel et al. 2002a). Leider gibt es wenige epidemiologische Daten über die geographische Ausbreitung von ESBLs des OXA-Typs (Paterson und Bonomo 2005).

1.4.2 OXA-Carbapenemasen

Die in Gruppe V zusammengefassten OXA Carbapenemasen spielen eine besondere Rolle bei der Ausbildung von Carbapenem-Resistenz einiger klinisch relevanter Spezies, vor allem bei *A. baumannii* und *P. aeruginosa*. *A. baumannii* ist ein wichtiger gramnegativer Erreger schwerer nosokomialer Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (Bergogne-Berezin und Towner 1996; Falagas et al. 2006). Carbapenem-Resistenz bei *A. baumannii* ist eine ernsthafte Bedrohung für die Handhabung dieses Keims, denn Carbapeneme sind derzeit die Antibiotika der Wahl bei der Behandlung von *Acinetobacter*-Infektionen, und in vielen Fällen auch die letzte Behandlungs-Option (Brown und Amyes 2006). Die Ausbreitung von Carbapenemase-positiven, oft multiresistenten *Acinetobacter*-Stämmen, stellt daher ein ernst zu nehmendes therapeutisches Problem dar.

OXA Enzyme mit Carbapenemase-Aktivität können auf der Basis ihrer Aminosäuresequenzen in 8 verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, wobei Vertreter der Untergruppen 1 bis 4 in *A. baumannii* nachgewiesen wurden (Walther-Rasmussen und Hoiby 2006). Während die Vertreter einer Gruppe zu ca. 92,5 % homolog sind, sind Enzyme verschiedener Untergruppen nur zu ~40 – 70 % identisch. Der erste Imipinem-resistente *A. baumannii* Stamm wurde bereits 1985 in Schottland isoliert. Später konnte gezeigt werden, dass die Resistenz durch eine ungewöhnliche OXA- β -Lactamase der Ambler Klasse D vermittelt wurde (Donald et al. 2000; Paton et al. 1993). Diese wurde OXA-23 genannt und als erste Variante der Untergruppe 1 klassifiziert. Weitere Vertreter dieser Untergruppe wurden in Asien entdeckt (OXA-27, OXA-49) (Afzal-Shah et al. 2001). In Europa wurden weitere OXA-Varianten gefunden (OXA-24, OXA-26 und OXA-40), die aufgrund ihrer geringen Identität (< 60 %) zur OXA-23-Gruppe als Untergruppe 2 bezeichnet wurden (Afzal-Shah et al. 2001; Bou et al. 2000; Heritier et al. 2003; Lopez-Otsoa et al. 2002). Die erste OXA β -Lactamase der Untergruppe 3 wurde in einem *A. baumannii*-Isolat aus Buenos Aires, Argentinien, gefunden und OXA-51 genannt (Brown et al. 2005). OXA-51 zeigte ebenfalls nur eine Ähnlichkeit von 60 % zur OXA-23- bzw. OXA-24-Gruppe. Mit Hilfe von neuen Primern zum PCR-Screening (Heritier et al. 2005) wurden in Stämmen von sechs Kontinenten inzwischen 39 β -Lactamasen dieser Untergruppe entdeckt (Brown und Amyes

2005; Evans et al. 2007; Evans et al. 2008; Tsakris et al. 2007). Diese unterscheiden sich in bis zu sechs Aminosäuren. Die Gene sind chromosomal codiert und es gibt Hinweise, dass sie intrinsisch für *A. baumannii* sind und daher zur Speziesidentifikation verwendet werden könnten (Turton et al. 2006). Die vierte Untergruppe wird von der Variante OXA-58 repräsentiert (Poirel et al. 2005). Anders als die Mehrzahl der Oxacillinasen anderer Gattungen, sind OXA-Gene von *Acinetobacter* meist chromosomal codiert. Nur OXA-23 und OXA-58 sind plasmidkodiert. Diese Varianten sind sehr erfolgreich bezüglich ihrer Verbreitung und wurden oft in Stämmen nachgewiesen, die für nosokomiale Ausbrüche verantwortlich waren (Dalla-Costa et al. 2003; Meric et al. 2008; Naas et al. 2005; Pournaras et al. 2006; Stoeva et al. 2008; Zong et al. 2008).

1.5. Diagnostische Methoden

Neben der Identifizierung von Infektionserregern ist die Bestimmung von Resistenzeigenschaften der nachgewiesenen Keime ein Schlüsselement der klinischen Diagnostik. Für den Therapieerfolg ist es entscheidend, dass möglichst schnell genaue Informationen über die Resistenzen des vermeintlichen Infektionserregers zur Verfügung stehen und eine geeignete Therapie eingeleitet werden kann (Paterson et al. 2001; Song et al. 2005). Bei Resistenzen, die mit der Produktion von ESBLs assoziiert sind, verbleiben oft nur wenige Therapiemöglichkeiten. Das Antibiotikum der Wahl ist meist ein Carbapenem (Paterson und Bonomo 2005). In verschiedenen Studien konnte die Produktion von ESBLs außerdem mit höheren Mortalitätsraten, verlängerten Patientenliegezeiten, einer Verzögerung bei der Einleitung einer geeigneten Therapie und höheren Kosten assoziiert werden (Melzer und Petersen 2007; Schwaber et al. 2006; Schwaber und Carmeli 2007). Zusätzlich zu diesen klinischen und wirtschaftlichen Aspekten zieht der Nachweis von ESBL-produzierenden Isolaten eine Reihe von Infektionskontroll- und Hygienemaßnahmen nach sich. So muss z. B. der entsprechende Patient isoliert werden, um eine weitere nosokomiale Ausbreitung zu vermeiden. Nachweismethoden, die schnell und eindeutig die potentielle Produktion von ESBLs detektieren und in der Lage sind, ESBL-assoziierte Resistenzen von Resistenzen, die durch andere Mechanismen verursacht werden, zu unterscheiden, sind daher von immenser Bedeutung, denn sie erlauben den gezielten Einsatz eines Antibiotikums und liefern Daten für Fragen der Epidemiologie, Infektionskontrolle und Krankenhaushygiene.

1.5.1 Phänotypischer ESBL-Nachweis

Für die kulturbasierte, phänotypische In-vitro-Testung der antimikrobiellen Wirkung von Substanzen auf nachgewiesene Infektionserreger, sind eine Reihe von Untersuchungsverfahren entwickelt worden, wie z. B. Mikrobouillondilutions-, Agardilutions- oder Agardiffusionstests. Zur Einschätzung von therapeutischen Optionen wird meist die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Als Referenzmethode zur Ermittlung einer MHK dient das Mikrobouillondilutionsverfahren, bei dem eine Verdünnungsreihe eines Antibiotikums in Nährmedium hergestellt und mit einer standardisierten Keimkonzentration angeimpft (Inokulum) wird. Nach einer ebenfalls standardisierten Bebrütung wird die geringste Konzentration des Antibiotikums, die gerade noch ein weiteres Wachstum des Infektionserregers verhindert, ermittelt und normalerweise in mg/L (oder µg/ml) angegeben. Die in vitro ermittelte MHK alleine lässt jedoch noch keine Beurteilung der mutmaßlichen therapeutischen Wirksamkeit zu, da sie pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter der Substanz nicht widerspiegelt. Daher wurden für standardisierte Beurteilungen Grenzwerte festgelegt, die eine Zuordnung der MHK-Werte zu den Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ erlauben. Neben den Bereichen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, werden für die Festlegung der Grenzwerte (für ein bestimmtes Antibiotikum) auch Daten zu Indikationsgebiet, Dosierung, Toxizität, Ergebnisse klinischer Prüfungen und Analyse von Fällen mit Therapieversagen berücksichtigt.

Die verschiedenen Aspekte können unterschiedlich gewertet werden und es verwundert daher nicht, dass verschiedene Organisationen, die sich mit der Findung dieser MHK-Grenzwerte beschäftigen, zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Von Bedeutung sind hierbei die amerikanischen Grenzwerte des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2009) und die Grenzwerte des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Kahlmeter et al. 2003), das sich um eine Harmonisierung der Grenzwerte in Europa bemüht.

Neben MHK-Bestimmungen mittels Bouillondilutionsverfahren werden aus Kostengründen häufig automatisierte oder vereinfachte Verfahren eingesetzt. Beim standardisierten Agardiffusionstest werden Filterpapierplättchen, die mit einer definierten Konzentration eines Antibiotikums getränkt sind, auf eine mit Keimen beimpfte Testplatte aufgelegt, der Durchmesser des nach Inkubation entstandenen Hemmhofs vermessen und dieser nach bestimmten Normen (z. B. CLSI) interpretiert. Eine Variante des Agardiffusionstests ist der Elipsilometerstest (E-Test). Beim E-Test wird im Gegensatz zum Plättchentest ein Teststreifen, der mit einem Antibiotikumgradienten getränkt ist, auf eine beimpfte Testplatte aufgelegt. Die MHK kann nach der Inkubation direkt am Teststreifen abgelesen werden, da die ellipsenförmige Hemmzone direkt dort zum Erliegen kommt. Halbautomatisierte Systeme, die das Wachstum von Testkeimen in Gegenwart verschiedener Substanzen und Konzentrationen messen, wie z. B. das VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) oder Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) System, tragen vor allem zur Optimierung von Arbeitsabläufen und Kosteneffizienz in klinischen Mikrobiologie-Laboren bei (Wiegand et al. 2007).

Der phänotypische Nachweis von ESBL-Produzenten gestaltet sich ist oft schwierig. Obwohl der Einsatz von Cephalosporinen bei der Behandlung von ESBL-produzierenden Infektionserregern zu Therapiefehlern führen kann, zeigen diese Keime oft nur leicht erhöhte MHKs gegenüber bestimmten Cephalosporinen mit breitem Wirkspektrum (Paterson und Bonomo 2005). Die vermittelten MHK-Werte können dabei im intermediären oder sogar sensiblen Bereich liegen, wenn konventionelle CLSI-Grenzwerte verwendet werden. Werden diese Werte als therapeutische Entscheidungshilfe herangezogen, kann es zu Fehlern bei der Wahl des Antibiotikums kommen. In diesem Szenario spielt auch der für ESBL-produzierende Keime bekannte Inokulum-Effekt eine Rolle. Er beschreibt das Phänomen eines signifikanten Anstiegs der MHK mit steigender Bakterienzahl. So können Erreger, die *in vitro* keinen „resistenten“ MHK-Wert gegenüber dem eingesetzten Cephalosporin zeigen, *in vivo* resistent sein, wenn an bestimmten Infektionsorten hohe Erregerzahlen vorherrschen. Für den phänotypischen Nachweis von ESBL-produzierenden Infektionserregern sieht die aktuelle CLSI-Richtlinie daher einen zweistufigen Prozess vor. Der erste Schritt besteht aus einem Screening nach reduzierter Empfindlichkeit gegenüber mehr als nur einem der Indikator-Cephalosporine Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefzadidim, Cefpodoxim und Aztreonam mit Agardiffusionstests oder Dilutionsverfahren. Die ESBL-Screening-Grenzwerte liegen dabei deutlich unter den konventionellen Grenzwerten. In einem zweiten Schritt muss die ESBL-Produktion bestätigt werden. Hierfür stehen einige Bestätigungstests zur Verfügung, die alle auf dem Nachweis des Synergieeffekts zwischen dem getesteten Antibiotikum und β -Lactamase-Inhibitoren basieren. Es wird also die Tatsache genutzt, dass ESBLs durch Clavulansäure gehemmt werden. Es wird empfohlen, Empfindlichkeitstestungen mit mindestens zwei der fünf Indikatorsubstanzen (meist Cefotaxim und Ceftazidim; evtl. zusätzlich Cefepim und/oder Aztreonam) jeweils mit und ohne Clavulansäure durchzuführen. Wenn der Keim gegenüber der Antibiotikum/Inhibitor-Kombination signifikant empfindlicher ist als gegenüber der Substanz alleine, gilt dies als ESBL-Bestätigung. Signifikanz ist dabei wie folgend definiert: (I) Abnahme der MHK-Werte um mindestens 3 Titerstufen (≥ 8 -fach) in Gegenwart von Clavulansäure, (II) Vergrößerung des Hemmhofes bei standardisierten Agardiffusionstests um mindestens 5 mm. Bei einer positiven Bestätigung wird der Infektionserreger unabhängig von den einzelnen MHK-Werten, als resistent gegenüber allen Penicillinen, Cephalosporinen (außer Cephamyne) und Aztreonam berichtet. MHK-Werte für β -Lactam/ β -Lactam-Inhibitor-Kombinationen werden unverändert berichtet.

Ein Standard-Test für die ESBL-Produktion in Enterobakterien ist der *Double Disk Synergy Test* (DDST) (Jarlier et al. 1988). Zwei Filterpapierplättchen, eines mit z. B. Cefotaxim (CTX) und eines mit Amoxicillin/Clavulansäure (AMC) getränkt, werden im Abstand von 30 mm auf eine beimpfte Testplatte aufgelegt. Zeigt der Hemmhof des CTX-Plättchens eine Erweiterung in Richtung des AMC-Plättchens, so ist Synergismus nachgewiesen (siehe Abbildung 1-2 a). Durch einen geringeren Abstand (20 mm) kann die Sensitivität des Tests erhöht werden (Thomson und Sanders 1992). Der zweiseitige Teststreifen des ESBL-E-Tests enthält zwei Gradienten eines Cephalosporins mit breitem Wirkspektrum. Auf der einen Seite einen ohne, und auf der anderen Seite einen mit Clavulansäure (z. B. Cefotaxim-CT/ Cefotaxim-Clavulansäure-CTL, siehe Abbildung 1-2 b) (Cormican et al. 1996). Für einen positiven Test müssen sich die MHK-Werte um mindestens 3 Titerstufen (s. o.) unterscheiden. Ein Nachteil dieser Tests ist jedoch die teils schwierige Interpretation der Ergebnisse, die nur durch geschultes Personal bewerkstelligt werden kann. Bei der *Combination Disk*-Methode (CDM) werden zwei Filterpapierplättchen, eines mit z. B. Cefotaxim und eines entsprechend mit Cefotaxim/Clavulansäure getränkt, getrennt ausgewertet. Für ein positives Resultat müssen sich die Durchmesser der beiden Hemmhöfe um mindestens 5 mm unterscheiden. Inzwischen werden auch von den Herstellern automatisierter Systeme ESBL-Tests angeboten, z. B. der VITEK 2 oder Phoenix ESBL-Test. Der ESBL-Test des Vitek 2 Systems testet z. B. das Wachstum eines Testkeims in Gegenwart von Cefepim, Cefotaxim und Ceftazidim jeweils mit und ohne Clavulansäure.

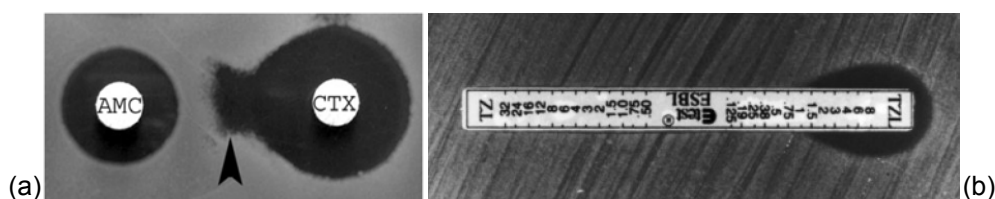


Abbildung 1-2: (a) Positiver DDST wie er in der Originalpublikation beschrieben wurde (Jarlier et al. 1988). Der Abstand der CTX- und AMC-Plättchen beträgt 30 mm. Der erweiterte Hemmhof des CTX-Plättchens (Pfeil) gilt als Nachweis der Synergie zwischen Cefotaxim und Clavulansäure. (b) ESBL E-Test mit Ceftazidim-Gradienten mit (TZL) und ohne Clavulansäure (TZ) (Livermore und Brown 2001)(siehe „Figure 2“). Die MHK für Ceftazidim beträgt > 32 mg/L (linker Gradient), die MHK für Ceftazidim/Clavulansäure nur 1,5 mg/L (rechter Gradient). Das Verhältnis der MHK_{TZ}/MHK_{TZL} ist damit ≥ 8 und der Test positiv.

Die zusätzliche ESBL-Bestätigung zögert das Testresultat um einen weiteren Tag hinaus. Die verwendeten Grenzwerte und die klinische Notwendigkeit eines ESBL-Screenings sind aktuell Themen einer anhaltenden Diskussion über die Korrektur und Harmonisierung der eingesetzten Grenzwerte. Ein großer Nachteil der CLSI-Richtlinie ist auch, dass sie nur für *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *P. mirabilis* bestätigt ist und damit nicht für AmpC-produzierende Spezies wie z. B. *C. freundii*, *Enterobacter spp.* oder *Morganella morganii*. Ein negativer Bestätigungstest (keine nachweisbare Hemmung durch Clavulansäure) nach einem positiven Screening kann mehrere Gründe haben: (I) Produktion von IRTs, (II) nicht oder nur schlecht durch Clavulansäure hemmbaren Klasse B oder D β -Lactamasen oder (III) plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen (z. B. bei *E. coli* oder *K. pneumoniae*) und (IV) Überproduktion von chromosomalen Cephalosprinasen (bei AmpC-Produzenten). Doi und Paterson (Doi und Paterson 2007) schlugen daher auf der Basis des CLSI-ESBL-Screenings ein Schema zur weiteren phänotypischen Analyse zugrunde liegender Resistenzmechanismen vor (siehe Abbildung 1-3). Dabei werden für Klasse B und C β -Lactamasen zusätzliche Bestätigungstest eingesetzt, die auf der Inhibition dieser β -Lactamasen durch EDTA oder Borsäure beruhen. Ein großes Problem stellt die Produktion einer ESBL in Gegenwart eines der erwähnten Enzyme dar. Dabei wird die Empfindlichkeit der ESBL gegenüber Clavulansäure maskiert. Diese Situation kann oft nicht mit phänotypischen Methoden aufgelöst werden.

Die beschriebenen Methoden sind günstig. Die Notwendigkeit von zusätzlichen Bestätigungstests und die zahlreichen Faktoren, die diese beeinflussen können, macht den phänotypische Nachweis von ESBLs in der Praxis aber oft schwierig, nicht ausreichend sensitiv, arbeits- und zeitintensiv (mindestens zwei Tage).

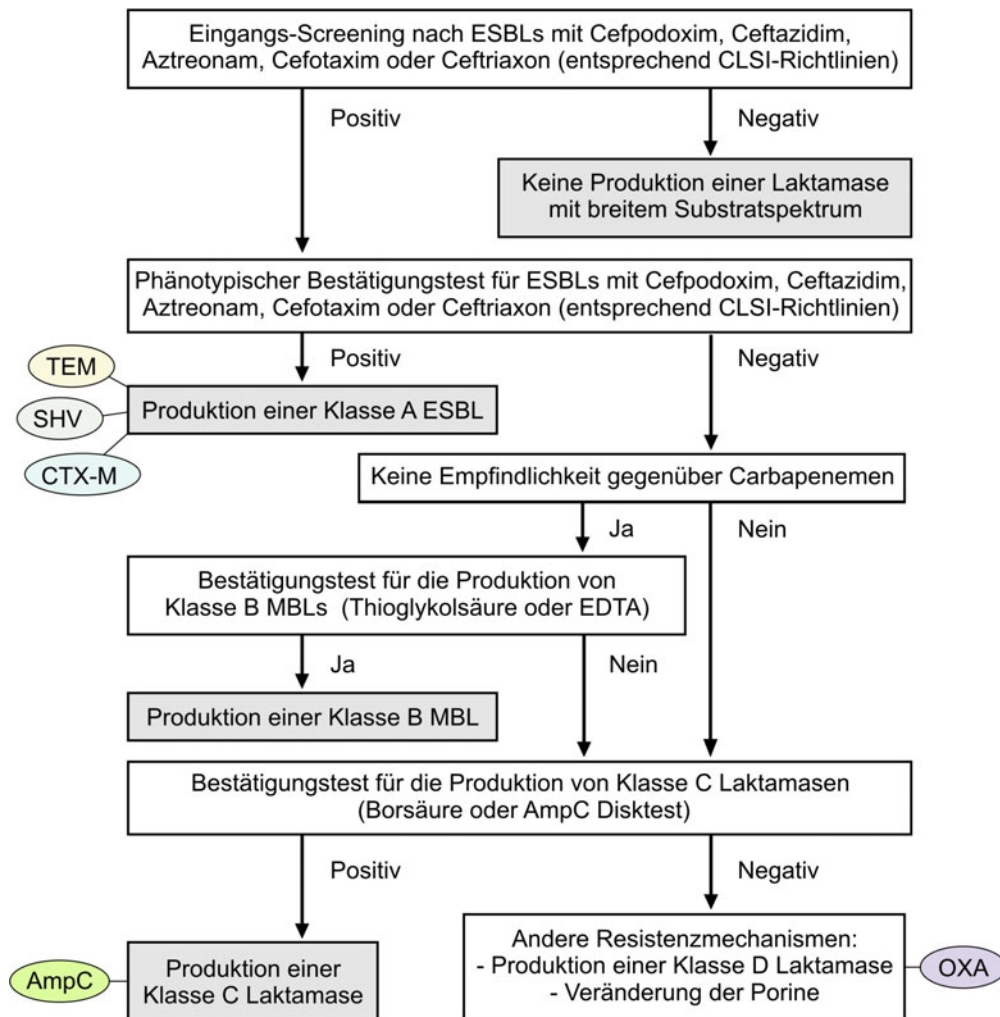


Abbildung 1-3: Von Doi und Kollegen (Doi und Paterson 2007) (siehe „Figure 1“) vorgeschlagene Vorgehensweise zum phänotypischen Nachweis von β -Lactamasen verschiedener Klassen. Dem CLSI-ESBL-Screening folgt neben dem ESBL-Bestätigungstest, ein Empfindlichkeitsstest gegenüber Carbapenemen und zusätzliche Bestätigungstests für Klasse B und C β -Lactamasen.

1.5.2 Genotypischer ESBL-Nachweis

Die molekularbiologische Analyse von Resistenzgenen vermeintlich ESBL-produzierender Keime ist eine viel versprechende Alternative zur klassischen phänotypischen Resistenztestung. Da im Gegensatz zu phänotypischen Methoden meist keine Isolation und Anzucht des ursächlichen Keims nötig ist, besitzen genotypische Methoden ein großes Potential zur Beschleunigung der Erregerdiagnostik. Die für die Testung notwendige DNA-Spezies kann im optimalen Fall direkt aus der klinischen Probe gewonnen und analysiert werden. Der Nachweis von ESBLs auf der genetischen Ebene ist unabhängig von Faktoren, die beim phänotypischen Nachweis große Probleme bereiten, wie die sehr unterschiedlichen Substrataffinitäten der möglichen ESBL-Vertreter, das Niveau der Genexpression, Störfaktoren, wie z. B. Inoculum-Effekt, Maskierung von Synergieeffekten und Koexistenz weiterer β -Lactamasen. Wenn genotypische Nachweisverfahren in der Lage sind, bestimmte

Genvarianten zu identifizieren und in der Routine eingesetzt werden, können sie zusätzlich wichtige epidemiologische Daten liefern. So kann z. B. ein isolierter Fall von der pandemischen Ausbreitung einer ESBL-Variante unterschieden werden.

Aus klinischer Sicht sind die Anforderungen an ein genotypisches Verfahren zur Resistenzdetektion je nach Resistenzmechanismus unterschiedlich. In manchen Fällen reicht der Gennachweis aus, um Aussagen bezüglich der Resistenz eines Isolats treffen zu können, wie z. B. bei MRSA (*mecA*-Nachweis). Kommt es aufgrund von Targetveränderungen zu Resistenz, müssen meist spezifische Änderungen (SNPs) im für das Target codierenden Gen identifiziert werden (z. B. *gyrA* bei Chinolonresistenz). In vielen Fällen muss ein Resistenzgen (oder mehrere Resistenzgene) nicht nur nachgewiesen, sondern auch charakterisiert werden. Ein Paradebeispiel sind die β -Lactamase-codierenden Gene, allen voran *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV}, die weitgehende evolutionäre Veränderungen durchlaufen haben (siehe 1.2.1). Informationen über Substratspektren des codierten Enzyms, welche für die Einleitung einer adequaten Antibiotikatherapie notwendig sind, liefern daher nur Verfahren, die in der Lage sind das nachgewiesene Gen vollständig zu charakterisieren. Aus epidemiologischer Sicht muss in allen Fällen der zugrunde liegende Resistenzmechanismus und die jeweilige Genvariante eindeutig identifiziert werden. Eine optimale molekularbiologische Methode zur ESBL-Detektion sollte also mehrere β -Lactam-Resistenzgene gleichzeitig nachweisen und die zur Identifikation eines bestimmten Allels notwendigen genetischen Merkmale identifizieren können.

Als Goldstandard zum genotypischen ESBL-Nachweis kann nach wie vor die Amplifikation verschiedener *bla*-Gene mit spezifischen Primern und die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte nach Sanger angesehen werden. Dieses Verfahren ist jedoch vergleichsweise zeitaufwändig und nicht für eine schnelle Erregerdiagnostik in der klinischen Routine geeignet. Inzwischen wurden zahlreiche PCR-Methoden, die mehrere ESBL- bzw. Cephalosporin-Resistenz-relevante *bla*-Gene in verschiedenen Multiplexformaten detektieren, beschrieben (Jemima und Verghese 2008; Monstein et al. 2007). Woodford und Kollegen entwickelten z. B. PCRs zur Detektion von *bla*_{CTX-M}-Genen der Gruppen M1, M2, M9, M8 und M26 und zur Detektion von Genen, die für Carbapenemasen der OXA-Gruppe V codieren (Woodford et al. 2006a; Woodford et al. 2006b). Eine weitere Multiplex-PCR wurde für den Nachweis von verschiedenen plasmidkodierten *ampC*-Genfamilien beschrieben (Perez-Perez und Hanson 2002).

Neben der Sequenzierung nach Sanger ist in den letzten Jahren eine enorme Zahl an Methoden zur Genotypisierung von DNA-Abschnitten entwickelt worden. Ein vollständiger Überblick über die beschriebenen Assays ist daher im Rahmen dieses Dokuments nicht möglich. Häufig verwendete Techniken sind jedoch: (I) Methoden, die physikalische Eigenschaften unterschiedlicher DNA-Spezies nutzen, wie z. B. Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen („*single strand conformation polymorphism*“, SSCP) oder denaturierende HPLC (DHPLC), (II) Methoden, die eine Enzymaktivität nutzen, wie z. B. Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen („*restriction fragment length polymorphism*“, RFLP, PCR-RFLP), (III) Methoden, die zusätzlich zu einer (Allel-) spezifischen Hybridisierung eine (spezifische) Enzymaktivität nutzen, wie z. B. Amplifikation mit allelspezifischen Primern, Primerelongations-Assays, Mini- und Pyrosequenzierung, Invader Assay, TaqMan-Assay oder DNA-Ligase Assays und (IV) Methoden, die ausschließlich auf allelspezifischer Hybridisierung beruhen, wie z. B. markierte Oligonukleotid-Sonden oder Microarrays (Ji und Manak 2002). Die allelspezifische Ausbildung von Holliday junctions kann ebenfalls zum Nachweis von SNPs genutzt werden (Yang et al. 2003). Bei Assays, die ausschließlich auf allelspezifischer Hybridisierung beruhen, sind ein sorgfältiges Design der allelspezifischen Oligonukleotide und stringente Bedingungen essentiell für die Spezifität der Methode. Weiterentwicklungen im Bereich der Sonden sind beispielsweise Spacersequenzen für eine verbesserte Hybridisierungseffizienz bei immobilisierten Sonden (Microarray) (Southern et al. 1999), PNA-Sonden (Gaylord et al. 2005), LNA-Sonden (Mouritzen et al. 2003), Molecular Beacons (Tyagi et al. 1998) und

Zip-Code-Sonden (Gerry et al. 1999). Ebenso vielfältig wie die Assays zur Genotypisierung sind die Methoden zur Detektion der entstandenen Produkte bzw. Signale. Neben elektrophoretischen Methoden und der Detektion entstandener Fluoreszenz oder Lumineszenz, können auch Microarrays, Massenspektroskopie, Flusscytometrie oder DNA-Sensoren mit verschiedenen Transduktionprinzipien eingesetzt werden (Dell'Atti et al. 2006; Drummond et al. 2003; Ito et al. 2007; Ji und Manak 2002; Sato et al. 2003).

Einige dieser Genotypisierungsmethoden wurden auch für die Charakterisierung von β -Lactam-Resistenzgenen eingesetzt. Zur Unterscheidung von TEM- und SHV-Varianten wurden z. B. folgende Verfahren beschrieben: (I) „Oligotyping“ von bla_{TEM} -Genen (Mabilat und Courvalin 1990), (II) Unterscheidung von bla_{TEM} -Genen mit Hilfe von Biotin-markierten Oligonukleotiden (Tham et al. 1990), (III) Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (PCR-SSCP) von bla_{SHV} (M'Zali et al. 1998), (IV) Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (PCR-RFLP) von bla_{TEM} (Arlet et al. 1995), bla_{SHV} (Nuesch-Inderbini et al. 1996) und zusätzlichen β -Lactam-Resistenzgenen (bla_{MOX-1} , bla_{MIR-1} , bla_{Toho-1}) (Lee et al. 2000) und (V) die Kombination aus PCR-SSCP und PCR-RFLP für die Analyse von bla_{SHV} (Chanawong et al. 2000). Diese Methoden sind jedoch nicht in der Lage die überwältigende Anzahl an bla_{TEM} und bla_{SHV} -Allelen, die seit ihrer Entwicklung beschrieben wurden, aufzulösen. Der limitierte Informationsgehalt und der oft hohe Arbeitsaufwand haben eine breite Akzeptanz dieser molekularbiologischen Methoden verhindert. Howard und Kollegen beschrieben einen Primerelongations-Assay zur Identifikation wichtiger Mutationen in den Codons von Aminosäure 238 und 240 des bla_{SHV} -Gens (Howard et al. 2002). PCR-Methoden wie die Real-time PCR (gekoppelt mit einer Schmelzkurvenanalyse) oder die Ligations-vermittelte PCR (LDR-PCR) wurden für die Genotypisierung von SHV, CTX-M und GES- β -Lactamasen entwickelt (Birkett et al. 2007; Niederhauser et al. 2000; Randegger und Hächler 2001; Weldhagen 2004). In der Real-time PCR wird meist der TaqMan-Assay verwendet, bei dem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von DNA-Polymerasen genutzt wird. Die Polymerase spaltet während der PCR-Reaktion die mit ihrer Zielsequenz hybridisierte und sowohl mit einem Fluorophor als auch einem Quencher bestückte TaqMan-Sonde und setzt so das Fluorophor frei. Diese Technik ist interessant für die Untersuchung einzelner Punktmutationen. Sie ist jedoch, trotz steigender Multiplexingkapazitäten einiger Real-time PCR-Systeme, nur begrenzt für die Analyse der extrem diversen β -Lactam-Resistenzgene geeignet.

Bei der Minisequenzierung wird im Gegensatz zur Primerelongation ein Primer um mehrere Nukleotide verlängert um den SNP und seine benachbarten Nukleotide zu identifizieren. Eine moderne Variante der Minisequenzierung ist die Pyrosequenzierung, die die Analyse von bis zu 100 bp langen DNA-Abschnitten erlaubt (Ronaghi 2001). Dabei wird das bei einem erfolgreichen Einbau eines bekannten Nukleotids freiwerdende Pyrophosphat mit Hilfe eines Enzymsystems in einen Lichtblitz umgesetzt und detektiert. Diese Technologie wurde bereits für den Nachweis von Mutationen, die für die Ausbildung von Chinolonresistenz (Gharizadeh et al. 2005), Makrolid-Resistenz (Haanpera et al. 2005), Linezolid-Resistenz (Sinclair et al. 2003) und Rifampin-Resistenz (Zhao et al. 2005) verantwortlich sind, eingesetzt. Jüngst wurden Assays für den Nachweis ESBL-relevanter Mutationen in bla_{TEM} bzw. bla_{SHV} und den Nachweis von CTX-M-Genen einschließlich deren Zuordnung in die bekannten CTX-M-Gruppen veröffentlicht (Jones et al. 2009; Naas et al. 2007). Wie die Sanger Sequenzierung liefert diese Methode vollständige Sequenzdaten zu einer bestimmten DNA-Region.

Stürenburg und Kollegen nutzten ein Massenspektrometrie-System (MALDI-TOF) zur Charakterisierung von bla_{SHV} -Genabschnitten (Stürenburg et al. 2006). Dafür wurde nach der Amplifikation des bla_{SHV} -Genabschnitts (Primer mit T7-Promotor) und der In-vitro-Transkription des PCR-Produkts ein Basen-spezifischer Verdau des einzelsträngigen RNA-Transkripts durchgeführt und die entstandenen Fragmente mit einem Massenspektrometer analysiert. Zur Identifizierung der SHV-Variante wurde das Signalmuster mit zuvor theoretisch berechneten Mustern bekannter bla_{SHV} -Gene abgeglichen. Unterschiede in den

Gensequenzen von 21 verschiedenen bla_{SHV} -Referenzgenen konnten korrekt identifiziert werden.

Fast alle dieser Techniken besitzen nur eine begrenzte Multiplexingkapazität. Die Anpassung dieser Verfahren an die Herausforderungen der Genotypisierung der extrem diversen β -Lactam-Resistenzgene, ist nur mit großem Zeit-, Arbeits- und technischem Aufwand sowie hohen Kosten möglich. Die Kombination einzelner Techniken mit Sequenzierungsmethoden ist nicht immer sinnvoll und oft nicht in der Routine umsetzbar. Eine viel versprechende Genotypisierungsplattform stellen daher DNA-Microarrays dar, da sie in einem einzigen Experiment, und damit in kurzer Zeit, eine große Menge an genetischer Information generieren können.

1.6. DNA-Microarrays

Microarrays sind wertvolle Werkzeuge für den hochparallelen, sensitiven und schnellen Nachweis und die Identifikation von DNA-Molekülen. Sie werden heute in vielen Bereichen eingesetzt und haben ein beträchtliches Potential für diagnostische Anwendungen in der klinischen Mikrobiologie. DNA-Microarrays für die Identifizierung und Charakterisierung von humanpathogenen Infektionserregern werden bereits jetzt in der klinischen Praxis getestet. Vor kurzen diskutierten Mikhailovich und Kollegen die besondere Bedeutung von Microarrays bei der Diagnose und Überwachung von Infektionskrankheiten (Mikhailovich et al. 2008). Ein großes Anwendungsgebiet von diagnostischen Microarrays ist die Speziesidentifikation. Für die klinische Anwendung wurden bereits Microarrays zur Identifizierung von Viren (Chizhikov et al. 2002; Hsia et al. 2007; Ryabinin et al. 2006), Bakterien (Fukushima et al. 2003; Hamels et al. 2001; Kakinuma et al. 2003; Volokhov et al. 2002; Volokhov et al. 2003; Wang et al. 2002a) und klinisch relevanter Pilze (Campa et al. 2008; Huang et al. 2006; Leinberger et al. 2005) entwickelt. Des Weiteren können Microarrays für die Charakterisierung von nachgewiesenen Infektionserregern eingesetzt werden. So wurden Microarrays für die Analyse der genetische Ausstattung eines Isolats hinsichtlich Pathogenitäts-, Virulenz- und Resistenz-Determinanten entwickelt (Bari et al. 2008; Bruant et al. 2006; Chen et al. 2005; Hamelin et al. 2006; Palka-Santini et al. 2009). In dieser Arbeit sollen DNA-Microarrays zum Nachweis und zur Genotypisierung verschiedener β -Lactam-Resistenzgene entwickelt und getestet werden.

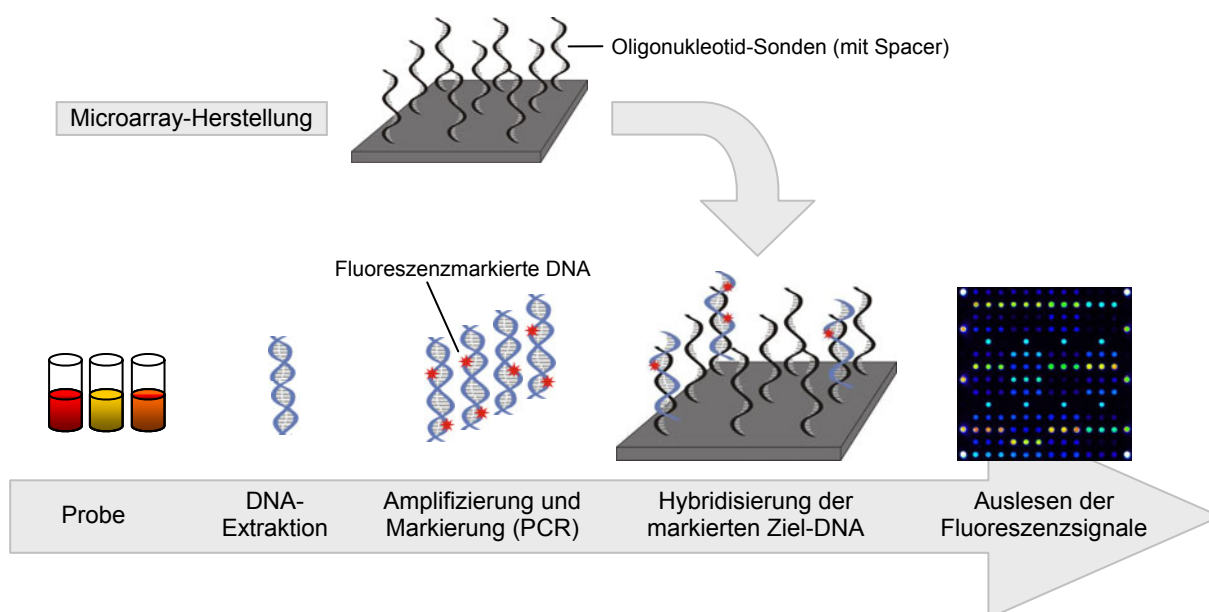


Abbildung 1-4: Prinzipieller Ablauf eines Microarray-basierten Verfahrens in der klinischen Mikrobiologie.

Für diagnostische Microarrays wurden verschiedenen Plattformen verwendet. Im Gegensatz zur photolithografischen Synthese von Sonden auf einer Oberfläche, wie es die Firma Affymetrix entwickelte, scheint für diagnostische Anwendungen eher die flexiblere Herstellung von Chips durch das Übertragen von vorsynthetisierten Sonden auf chemisch modifizierte Träger sinnvoll (Mikhailovich et al. 2008). Der typische Ablauf eines Microarray-basierten diagnostischen Verfahrens ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Für die direkte Analyse der aus einer klinischen Probe extrahierten DNA sind die meisten Detektionsmethoden nicht sensitiv genug. Die Zielsequenzen müssen daher in der Regel amplifiziert werden. Zur Erhaltung der Multiplexingkapazität müssen viele Zielsequenzen gleichzeitig vervielfältigt werden, was oftmals den Flaschenhals der Methode darstellt. Für die Markierung der Ziel-DNA und die anschließende Signaldetektion stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, wie z. B. Fluoreszenzfarbstoffe, Quantum Dots, Komplexe aus Biotin-Streptavidin, enzymbasierte kolorimetrische Verfahren, Silberfärbung usw..

Von den in Kapitel 1.5.2 beschriebenen Genotypisierungs-Assays wurden einige auf DNA-Microarray-Formate übertragen. Die drei häufigsten Reaktionsprinzipien sind dabei: (I) Primerelongations-Assays, (II) DNA-Ligase Assays und (III) allelspezifischer Hybridisierung. Während in Primerelongations- und DNA-Ligase Assays, zusätzlich zur Hybridisierung, Enzymreaktionen durchgeführt werden müssen, müssen bei der allelspezifischen Hybridisierung vor allem die Hybridisierungs- und Waschbedingungen kontrolliert werden, um eine hohe Spezifität zu erzielen. Es wurden verschiedene arraybasierte Primerelongations-Verfahren entwickelt: (I) Nach der Anlagerung der Ziel-DNA werden immobilisierte Primer auf der Oberfläche eines Chips verlängert. Das detektierbare Signal entsteht auf dem Chip. (II) Die Verlängerung findet mit Primern in Lösung statt, die mit so genannten *Tags* versehen sind. Das entstandene und mit *Tag*-Sequenzen versehene Produkt wird anschließend durch Hybridisierung mit den entsprechenden Sonden eines *Tag*-Arrays nachgewiesen. Dieselben zwei prinzipiellen Varianten wurden auch für arraybasierte DNA-Ligase Assays beschrieben. Eine besondere Entwicklung im Bereich der Sonden sind die so genannten Padlock-Sonden, denn hier ist das Produkt der Ligation ein zirkuläres DNA-Molekül, das für weitere Reaktionen zur Verfügung steht (z. B. Detektion mittels Microarray, RCA) (Baner et al. 2003).

Zur Genotypisierung von Punktmutationen wird in DNA-Microarray-Formaten häufig auf das Prinzip der allelspezifischen Hybridisierung zurückgegriffen (Abbildung 1-5). Dabei werden für jeden SNP normalerweise vier Sonden entwickelt, deren Sequenzen sich nur im zum potentiellen Mutationsort komplementären Nukleotid unterscheiden. Die vier Sonden besitzen dort jeweils ein A, G, C oder T. Bei der Hybridisierung der Sonden mit dem zu untersuchenden Abschnitt der markierten Ziel-DNA ist eine Sonde perfekt komplementär (Perfect Match, PM), während drei Sonden eine nicht passende Base (Mismatch, MM) zur Ziel-DNA aufweisen. Unter stringenten Bedingungen führt der destabilisierende Effekt des Mismatch zu einer Verringerung der Hybridisierungseffizienz und damit der Signalintensität. Dieser Effekt ist am größten, wenn sich die kritische Base in der Mitte der Sondensequenz befindet (Letowski et al. 2004). Die höchste Signalintensitäten liefern also die jeweils perfekt komplementären Sonden, was eine Identifikation der SNPs ermöglicht. Bei dieser Methode haben Sondendesign und Wahl der Hybridisierungs- bzw. Waschbedingungen einen kritischen Einfluss auf die Spezifität der Hybridisierung.

In den letzten Jahren wurden einige DNA-Microarrays zum Nachweis von Resistenz-Determinanten beschrieben. Diese Arbeiten beschäftigten sich zumeist mit Resistenzgenen bestimmter Spezies, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis* und *Escherichia coli* (Antwerpen et al. 2007; Bruant et al. 2006; Monecke und Ehrlich 2005; Strommenger et al. 2007; Tang et al. 2005; Weile et al. 2007; Zhu et al. 2007b) oder fokussierten sich auf bestimmte Resistenzmechanismen, wie z. B. Fluorchinolon-, Makrolid-, Glycopeptid- und β -Lactam-Resistenz (Barl et al. 2008; Cassone et al. 2006; Cassone et al. 2008; Lee et al. 2002). Weitere Microarrays wurden für gramnegative Bakterien, (Batchelor et al. 2008; Chen et al.

2005; Frye et al. 2006; Perreten et al. 2005), grampositive Bakterien (Perreten et al. 2005) oder Sepsis (Cleven et al. 2006) entwickelt.

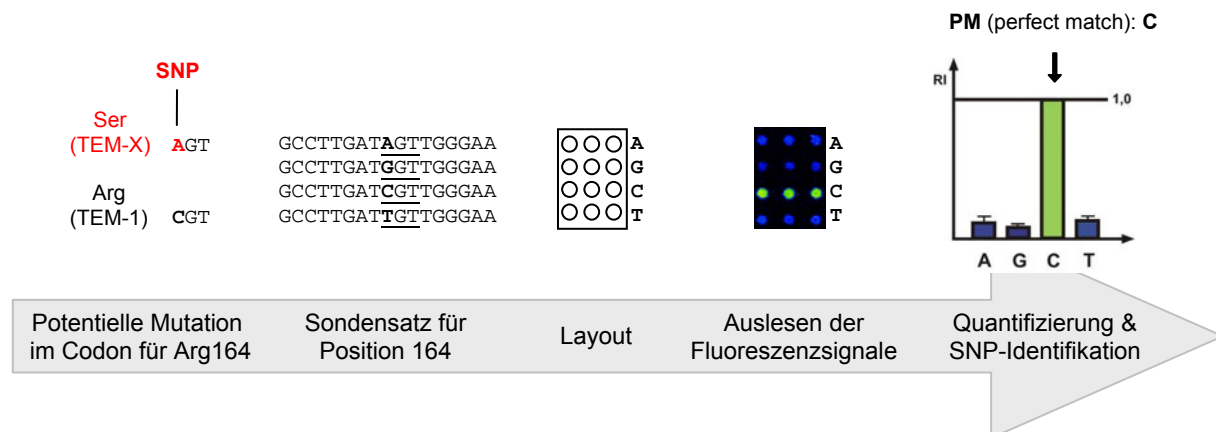


Abbildung 1-5: Prinzip der Identifikation von Punktmutationen mittels DNA-Microarrays auf der Basis allelspezifischer Hybridisierung. Erläuterungen im Text.

Doch trotz der teilweise enormen Anzahl von bis zu 90 verschiedenen Resistenzgenen und der damit sehr umfassenden Analyse der genetischen Ausstattung eines Isolates, wurden β -Lactam-Resistenzgene meist nur auf der Ebene der Genfamilie detektiert. Ohne eine Identifikation relevanter Punktmutationen ist z. B. der Nachweis eines *bla_{TEM}*- oder *bla_{SHV}*-Gens nur von limitiertem klinischem Nutzen, da nicht genügend Informationen für Rückschlüsse auf das Substratspektrum des codierten Enzyms zur Verfügung stehen. Diese Information ist jedoch essentiell für eine Therapieempfehlung. Zhu und Kollegen untersuchten deshalb mit einer Microarray-basierten Methode sechs Mutationen im *bla_{SHV}*-Gen (Zhu et al. 2007a).

Grimm und Kollegen beschrieben einen DNA-Microarray für die Genotypisierung von TEM- β -Lactamasen (Grimm et al. 2004). Dieser am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart entwickelte Microarray umfasste Sonden zur Identifikation von 42 Polymorphismen innerhalb des *bla_{TEM}*-Gens, und diente als Machbarkeitsstudie für das in Abbildung 1-5 erläuterte, auf allelspezifischer Hybridisierung basierende Assay-Konzept. Zum Zeitpunkt der Entwicklung war der Chip in der Lage, 99 % der über 120 bekannten TEM- β -Lactamasen zu identifizieren. Aus dieser Entwicklung gingen weitere Microarrayprototypen zur Genotypisierung von β -Lactamasegenen hervor. Die Genotypisierung von SHV- β -Lactamasen basierte auf der Charakterisierung von 35 SNPs sowie drei weiteren Sequenzunterschieden in *bla_{SHV}*, und erlaubte die Identifikation von über 50 SHV-Allelen (Grimm 2005). Ein Microarray zur Genotypisierung von CTX-M- β -Lactamasen wurde in Kooperation mit Maya Rubtsova von der Chemischen Fakultät der M. V. Lomonosov Moscow State University in Moskau, Russland, entwickelt. Dieser Chip nutzte 47 Polymorphismen für die Zuordnung des detektierten *bla_{CTX-M}*-Gens zu einer bestimmten CTX-M-Gruppe (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 oder CTX-M8) und die Identifikation der CTX-M Variante. Zuletzt wurde mit der Entwicklung eines DNA-Microarrays zum molekularen Nachweis von β -Lactamasen der Klasse D (Oxacillinasen) begonnen (Henn 2006). Es wurden 148 spezifische Sonden zum Nachweis von Vertretern der OXA-Gruppen I, II (OXA-ESBLs) und V (OXA-Carbapenemasen) entwickelt.

Eine Anwendung der beschriebenen Microarraytechnologien in der patientennahen Sofortdiagnostik (Point-of-Care, POC) in Krankenhäusern der Industriestaaten oder deren Nutzung in Ländern mit wenigen Ressourcen erfordert, eine starke Vereinfachung und Integration der Verfahren (Weigl et al. 2008). Mikrofluidik-Systeme, wie z. B. μ TAS, lab-on-a-chip oder BioMEMS, die verschiedene Schritte eines Assays (Probenaufarbeitung, Isolation

des Ziel-Moleküls, Amplifikation, Detektion und Auslesen der Signale) in einem einzigen System integrieren und damit unabhängig vom Benutzer machen, bieten in diesem Bereich viele Möglichkeiten. Im Bereich der Pathogendetektion wurden bereits einige Konzepte beschrieben (Liu et al. 2004; Liu et al. 2006), wobei die Entwicklung von anderen Bereichen der Bioanalytik profitiert, wie beispielsweise dem integrierten Nachweis von Biomarkern (Fan et al. 2008) oder der Nano-Diagnostik (Jain 2008). Auch der molekularbiologische Nachweis von Resistenz mittels Microarrays könnte in Zukunft mit Hilfe dieser Entwicklungen einfacher und kosteneffizienter gestaltet werden.

1.7. Zielstellung dieser Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines molekularbiologischen Verfahrens für die schnelle Identifizierung von bakteriellen β -Lactam-Resistenzen in der klinischen Routine und für epidemiologische Studien. Hierfür sollten diagnostische DNA-Microarrays zum Nachweis und zur eindeutigen Identifizierung der wichtigsten β -Lactamasegene gramnegativer Mikroorganismen entwickelt, etabliert und mit klinischen Isolaten validiert werden. Zur Identifizierung sollte eine Genotypisierung relevanter Mutationen innerhalb der verschiedenen *bla*-Gene durchgeführt werden. Der auf allelspezifischer Hybridisierung basierende Assay sollte dabei möglichst schnell, sensitiv und spezifisch sein und eine hohe Abdeckung bezüglich bekannter Genvarianten besitzen.

Auf der Basis früherer Vorläuferstudien am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart (siehe 1.6) sollten in dieser Arbeit Aspekte der Assay- und Microarrayentwicklung mit folgenden Zielen bearbeitet werden:

- Integration von Sondensätzen zur Genotypisierung der wichtigsten ESBL relevanten Resistenzgene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} als Module eines ESBL-Chips und Aktualisierung dieser Chipmodule zum eindeutigen Nachweis aller bekannten *bla*-Allele zum Zeitpunkt der Entwicklung. Optimierung in den Bereichen Sondendesign und Hybridisierungsbedingungen. Integration der Präanalytik durch die Etablierung einer Amplifikationsstrategie für *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}.
- Validierung des integrierten ESBL-Microarrays anhand klinischer Isolate und Vergleich der Ergebnisse mit Daten phänotypischer Methoden.
- Neuentwicklung eines DNA-Microarrays zum Nachweis und zur Identifikation bekannter plasmidkodierten AmpC β -Lactamasen der sechs Hauptgruppen (CIT; ACC; FOX; ENT; DHA; AER) und Validierung des AmpC-Microarrays mit Referenzmaterial zur Analyse der Leistungsfähigkeit der Sondensätze. Entwicklung von Sonden, die aufgrund ihrer Eigenschaften eine Integration des AmpC-Microarrays als weiteres Chipmodul in den ESBL-Chip zulassen.
- Vervollständigung der Validierung des Microarray-Prototyps zur Genotypisierung von β -Lactamasen des OXA-Typs mit Vertretern der wichtigen OXA-Gruppe V (OXA-Carbapenemasen) und Analyse der getesteten Sondensätze.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism 377-DNA-Sequencer	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Elektrophorese-System	Power Pac 300, Sub Cell GT	Biorad (München, Deutschland)
Geldokumentationssystem	Image Reader Las-1000 Plus	Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Hybridisierungssofen	OV5 Hybridisierungssofen	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Hybridisierungsstation	HS 400 Hybridization Station	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
<i>Lab-on-a-chip</i> Elektrophorese	Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
PCR-Cycler	MasterCycler Gradient, MasterCycler ep Gradient und MasterCycler ep Gradient S PTC-150 MiniCycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland) MJ Research (Waltham, USA)
Nadeln für den Kontaktdruck	PT 3000 Split Pins	Point Technologies (Boulder, USA)
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW (Weinheim, Deutschland)
Scanner für Microarrays	LS Reloaded	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Scanner für Microarrays	Scan Array Express	PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
<i>Slide-Adapter</i>	Thermomixer <i>Slide Adapter</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spektrophotometer	ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Kontaktdrucker (Spotter)	Microgrid II Microarrayer	Biorobotics (Cambridge, UK)
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trocknungskompartiment	Universal Oven (Model U)	Memmert (Schwabach, Deutschland)
UV-Leuchttisch	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech (Ebersbach, Deutschland)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Zentrifuge	5417C, 5810R und MiniSpin	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 99 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LiChrosolv (HPLC Wasser)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau, Orange G, XylenCyanol FF, DMSO, CaCl ₂ , Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylenglykol, HCl, KCl, MgSO ₄ , Na ₃ Citrat · 2H ₂ O, NaCl, Na ₂ EDTA · H ₂ O, Na ₂ SO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, NaOH, Triton X-100, EGTA Glycerin, Tris	Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) Riedel de Haën (Seelze, Deutschland)

2.1.3 Bioreagenzien und Kits

Bioreagenzien und Kits	Hersteller
Big-dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
DNA 1000 LabChip Kit	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
DNA-Längenstandard: 1kb DNA Ladder	Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
DNA-Längenstandard: FastRuler DNA Ladder, Low Range und 6x Orange G/Xylencyanol DNA Probenpuffer	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
dNTPs	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) oder Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland)
FluoroLink Cy3-dCTP	GE Healthcare (München, Deutschland)
Oligonukleotid-Sonden mit 5' Aminomodifikation, Oligonukleotid-Sonden mit 5' Aminomodifikation und 3' Cy3-Modifikation und Primer	Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland)
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit, Multiplex PCR Master Mix, HotStar Taq DNA Polymerase und QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RQ1 RNase-Free DNase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Taq DNA Polymerase, Taq Puffer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
384 Well Polystyrol(PS)-Microplatten (U-Form), Pipettenspitzen	Greiner bio-one (Frickhausen, Deutschland)
Abdeckfolie für Microplatten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>Epoxy coated glass slides</i> (3D)	Elipsa (Berlin, Deutschland)
<i>Gene Frames</i> und <i>Cover Slips</i>	Abgene (Hamburg, Deutschland)
Nexterion Slide E und Druckpuffer Nexterion Spot III	Schott (Jena, Deutschland)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Spottingpuffer für Nexterion Slide E	Modifizierter Nexterion Spot Puffer = 0,0075 % Triton X-100 in Nexterion Spot Puffer
Spottingpuffer für <i>Epoxy coated glass slides</i> (3D, Elipsa)	160 mM Na ₂ SO ₄ 130 mM Na ₂ HPO ₄
Spüllösung 1	0,1 % (V/V) Triton X-100
Spüllösung 2	0,5 µl konzentrierte HCl/ ml ddH ₂ O
Spüllösung 3	100 mM KCl
Blocklösung	25 % (v/v) Ethylenglykol 0,5 µl konzentrierte HCl/ ml ddH ₂ O
10x DNase-Puffer	400 mM Tris-HCl (pH 8) 100 mM MgSO ₄ 10 mM CaCl ₂
20x SSPE	2,98 M NaCl 200 mM Phosphatpuffer 20 mM EDTA pH 7,4

Name		Zusammensetzung
20x SSC		3 M NaCl 300 mM Na ₃ Citrat·2 H ₂ O pH 7,0
50x TAE-Puffer		2M Tris-Acetat-Puffer 50mM EDTA pH 8,5
Waschlösung 1	Waschlösungen 1, 2, und 3 wurden sowohl für Nexterion	2x SSC 0,2 % SDS
Waschlösung 2	Slide E als auch für <i>Epoxy coated</i>	2x SSC
Waschlösung 3	<i>glass slides</i> (3D, Elipsa) verwendet	0,2x SSC

2.1.6 Software

Software	Hersteller bzw. Link
Kommerzielle Software	
BioSizing (Version A.02.11)	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
TAS Application Suite (Version 2.6)	Biorobotics (Cambridge, UK)
EditSeq (Version 5.0), SeqMan II (Version 5.0)	DNASStar (Madison, USA)
ICS-501 Image Capture	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Origin 5.0	Microcal Software (Northampton, USA)
MS Excel (2003)	Microsoft (Redmond, USA)
Oligo (Version 6.65)	Molecular Biology Insights (Cascade, USA)
ScanArray Express (Version 3.0)	Perkin Elmer (Weiterstadt, Deutschland)
Array Designer (Version 3.0)	PREMIER Biosoft International (Palo Alto, Canada)
Tecan HS Control Manager	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Kostenlose Software	
ClustalX (Version 1.81)	ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/
Treeview (Version 1.6.6)	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
OligoAnalyzer	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer
BioEdit (Version 7.0.)	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

2.1.7 Stämme und Isolate

2.1.7.1. Referenzstämme

Spezies	Bezeichnung/Beschreibung	Herkunft	Genotyp
TEM Referenzmaterial			
<i>Escherichia coli</i>	Referenzstamm	RKI	TEM-3
<i>Escherichia coli</i>	Referenzstamm	RKI	TEM-7
<i>Escherichia coli</i>	Referenzstamm EARSS 1528	RKI	TEM-8
<i>Escherichia coli</i>	K12, <i>bla</i> _{TEM} auf Plasmid pUC19	ITB	TEM-116
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	diverse klinische Isolate	RBK	TEM-1
SHV Referenzmaterial			
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α , <i>bla</i> _{SHV} auf Plasmid pCCR9	ZÜR	SHV-1

Material und Methoden

Spezies	Bezeichnung/Beschreibung	Herkunft	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α , <i>bla</i> _{SHV} auf Plasmid pCCR9	ZÜR	SHV-2
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α , <i>bla</i> _{SHV} auf Plasmid pCCR9	ZÜR	SHV-5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	diverse klinische Isolate	KRO	SHV-1, -5, -12
CTX-M Referenzmaterial			
<i>Citrobacter freundii</i>	klinisches Isolat ESBL99 (761)	TOM	CTX-M-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinisches Isolat 3-1	k.A.	CTX-M-3
<i>Salmonella typhimurium</i>	klinisches Isolat 5-1	MOS	CTX-M-5
k.A.	klinisches Isolat 14-1	k.A.	CTX-M-14
<i>Enterobacter spec.</i>	klinisches Isolat	FRA	CTX-M-9
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat 43 (1140)	MOS	CTX-M-14
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat 14 (14699)	MOS	CTX-M-15
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat 23 (15088)	MOS	CTX-M-15
OXA Referenzmaterial			
<i>Escherichia coli</i>	Referenzstamm (K12J53 RGN 231)	RKI	OXA-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	klinisches Isolat	RBK	OXA-17
<i>Escherichia coli</i>	Referenzstamm (K12J53 R57)	RKI	OXA-21
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab33	EDI	OXA-23
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab34	EDI	OXA-24
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab15	EDI	OXA-69
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab64	EDI	OXA-65
<i>Acinetobacter spec.</i>	klinisches Isolat A332	EDI	OXA-66
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab79	EDI	OXA-70
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab62	EDI	OXA-64
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab35	EDI	OXA-58
<i>Acinetobacter baumannii</i>	klinisches Isolat Ab38	EDI	OXA-58
AmpC Referenzmaterial			
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat 40/04	RKI	CMY-2
<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat 102/04	RKI	CMY-16

2.1.7.2. Klinische Isolate

Nummer	Spezies	klinische Probe	Bezeichnung	Herkunft	ESBL-Phänotyp
1	<i>Klebsiella terrigena</i>	Bronchialsekret	VA01619	FRA	+
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	VA01036	FRA	+
3	<i>Enterobacter intermedium</i>	Urin	VA45679	FRA	+
4	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA45097	FRA	+
5	<i>Escherichia coli</i>	Analabstrich	VA45577	FRA	+
6	<i>Escherichia coli</i>	Analabstrich	VA45358	FRA	+
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin	VA44120	FRA	+
8	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA43936	FRA	+
9	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA41787	FRA	+
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blut	VA40703	FRA	+
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Wundabstrich	VA00015	FRA	+
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	VA46467	FRA	+
13	<i>Escherichia coli</i>	Wundabstrich	VA27303	FRA	+
14	<i>Klebsiella terrigena</i>	Urin	VA26141	FRA	+
15	<i>Klebsiella terrigena</i>	Rachenabstrich	VA25940	FRA	+
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	VA25508	FRA	+

Nummer	Spezies	klinische Probe	Bezeichnung	Herkunft	ESBL-Phänotyp
17	<i>Klebsiella terrigena</i>	Urin	VA04602	FRA	+
18	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA05943	FRA	+
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Wundabstrich	VA03414	FRA	+
20	<i>Escherichia coli</i>	Mittelstrahlurin	464946	RBK	+
21	<i>Klebsiella terrigena</i>	Abszessabstrich	435063	RBK	+
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Abstrich	459185	RBK	+
23	<i>Rahnella aquatilis</i>	Rachenabstrich	628283	RBK	-
24	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Mittelstrahlurin	404541	RBK	+
25	<i>Klebsiella spec.</i>	-	stunbek	RBK	+
26	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA25164	FRA	+
27	<i>Escherichia coli</i>	Blasenkatheterspitze	VA24790	FRA	+
28	<i>Klebsiella terrigena</i>	Vaginalabstrich	VA24796	FRA	+
29	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Wundabstrich	VA24453	FRA	+
30	<i>Escherichia coli</i>	Vaginalabstrich	485291	RBK	+
31	<i>Escherichia coli</i>	ZVK Spitze	474368	RBK	+
32	<i>Escherichia coli</i>	Blutkultur	469550	RBK	+
33	<i>Escherichia coli</i>	Mittelstrahlurin	438706	RBK	+
34	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA20778	FRA	+
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rachenabstrich	VA21397	FRA	+
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	VA17878	FRA	+
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nasenabstrich	VA24777	FRA	+
38	<i>Escherichia coli</i>	Wundabstrich	VA24456	FRA	+
39	<i>Escherichia coli</i>	Abszessabstrich	VA24455	FRA	+
40	<i>Escherichia coli</i>	Urin	VA23873	FRA	+
41	<i>Escherichia coli</i>	Wundabstrich	VA23342	FRA	+
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bronchialsekret	VA22572	FRA	+
43	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Gallenflüssigkeit	481772	RBK	+
44	<i>Escherichia coli</i>	Abstrich intraoperativ	477414	RBK	+
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	445760	RBK	+
46	<i>Escherichia coli</i>	Abstrich	474074	RBK	+
47	<i>Proteus vulgaris</i>	Nasenabstrich	VA16192	FRA	+
48	<i>Escherichia coli</i>	Hautabstrich	633831	RBK	+
49	<i>Klebsiella spec.</i>	Trachealsekret	435727	RBK	+
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trachealsekret	411586	RBK	+
51	<i>Klebsiella spec.</i>	Dekubitusabstrich	456789	RBK	+
52	<i>Klebsiella spec.</i>	Uricult Dauerkatheter	491122	RBK	+
53	<i>Escherichia coli</i>	Trachealsekret	471552	RBK	+
54	<i>Citrobacter freundii</i>	Mittelstrahlurin	427499	RBK	+
55	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Vaginalabstrich	479982	RBK	+
56	<i>Escherichia coli</i>	Vaginalabstrich	445421	RBK	+
57	<i>Escherichia coli</i>	Vaginalabstrich	VA06105	FRA	+
58	<i>Escherichia coli</i>	Leistenabstrich	VA07443	FRA	+
59	<i>Escherichia coli</i>	Rachenabstrich	VA08465	FRA	+
60	<i>Escherichia coli</i>	Blutkultur	VA09383	FRA	+
61	<i>Escherichia coli</i>	Dekubitusabstrich	VA16561	FRA	+
62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mittelstrahlurin	429457	RBK	-

2.2. Methoden

2.2.1 Sequenzanalyse

Mit Hilfe von multiplen Sequenzalignments verfügbarer Nukleotidsequenzen verschiedener β -Lactamasegene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden Sequenzunterschiede, hauptsächlich Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), die zu Aminosäureaustauschen führen, identifiziert. Die größte Referenz bezüglich bereits publizierter Aminosäureaustausche verschiedener Enzymgruppen bot hierbei die von George Jacoby und Karen Bush initiierte Internetseite <http://www.lahey.org/studies>. Die Sequenzvergleiche wurden mit der Software ClustalX (Thompson et al. 1997), BioEdit (Hall 1999) oder SeqMan II erstellt.

2.2.2 Sondendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden (I) bereits entwickelte Sonden der TEM-, SHV- und CTX-M-Chipmodule auf einem Chip integriert, (II) diese teilweise überarbeitet und verbessert (Redesign) und (III) SONDENSÄTZE für die Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule und für einen neuen Chip zur Genotypisierung plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen neu entwickelt. Im Bereich der Genotypisierung der Klasse D β -Lactamasen (OXA) wurden keine weiteren Sonden entworfen, sondern auf bereits entwickelte Sonden zurückgegriffen (Henn 2006). Das Sondendesign erfolgte in allen Fällen nach den im Folgenden beschriebenen Prinzipien.

2.2.2.1. Standard-Sondendesign

Zur Genotypisierung relevanter Punktmutationen innerhalb der verschiedenen Zielgene wurden Oligonukleotid-Sonden mit Längen von 14 - 27 Basen entwickelt. Für jeden SNP wurden vier Sonden entwickelt, deren Sequenzen sich nur im zum potentiellen Mutationsort komplementären Nukleotid unterschieden. Die vier Sondensequenzen enthielten dort jeweils ein A, G, C oder T. Zur Optimierung der Unterscheidung zwischen Perfect Match und Mismatch während der Hybridisierung entsprach die Mutationstelle im Idealfall dem zentralen Nukleotid der Sonde. Die thermodynamischen Eigenschaften jeder Sonde (Schmelztemperatur T_M , thermische Stabilitäten möglicher Sekundärstrukturen wie Haarnadel- und Dimer-Strukturen) wurden mit Hilfe des Onlinetools OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) berechnet, wobei die standardmäßigen Einstellungen für monovalente Ionen (50 mM) und DNA-Konzentration (0.25 μ M) verwendet wurden. Die Stabilitäten der Sekundärstrukturen wurden als Werte der freien Energie (ΔG) ausgegeben und als $\Delta G_{\text{Haarnadel}}$ und ΔG_{Dimer} bezeichnet. Folgende Bereiche und Grenzwerte wurden als optimal betrachtet: T_M : $53 \pm 3,5$ °C; $\Delta G_{\text{Haarnadel}} \geq 0$ kcal/mol and $\Delta G_{\text{Dimer}} \geq -6$ kcal/mol. Alle Sonden wurden in Sense-Richtung entworfen.

Jeder SONDENSATZ wurde nach der Position des entsprechenden AS-Austausches benannt. Sofern nicht anders angegeben, folgte die Nummerierung der Aminosäuren nach dem von Ambler und Kollegen vorgeschlagenen Nummerierungs-Schema für Klasse A β -Lactamasen (Ambler et al. 1991). Bei 14 AS-Positionen waren verschiedene Mutationen innerhalb desselben Triplets relevant. Diese führten entweder zum selben Austausch oder zu unterschiedlichen AS-Substitutionen. In solchen Fällen wurden mehrere komplette SONDENSÄTZE (z. B. 2 x 4 Sonden) entworfen und diese entsprechend durchnummeriert (z. B. TEM 164.1 und 164.2). Sechs AS-Substitutionen traten an derselben Position in unterschiedlichen CTX-M-Untergruppen auf. Die Bezeichnungen dieser SONDENSÄTZE wurde entsprechend der CTX-M-Untergruppe erweitert (z. B. CTX-M 167.M1 and CTX-M 167.M9).

2.2.2.2. Alternatives Sondendesign

(I) Der Sondensatz für die Positionen 238 und 240 der SHV-Aminosäuresequenz deckt die ESBL-relevanten Substitutionen G238S, G238A und E240K ab (Gniadkowski 2008) und umfasst insgesamt neun Sonden. Da im Bereich dieser beiden Positionen mehrere Mutationen beschrieben sind und diese zu einer Vielzahl von AS-Kombinationen führen, wurde für jede der verschiedenen Sequenzvarianten eine passende Sonde entwickelt. Die Benennung erfolgte gemäß der codierten Aminosäuren an den Positionen 238 und 240 (GE, SE, SK, AE, AK) und dem letzten Nukleotid des Codons für Aminosäure 240 (GEa oder GEg). Eine ausführliche Betrachtung dieses Sondensatzes erfolgt in Kapitel 3.1.4.2.

(II) An einigen AS-Positionen oder in deren unmittelbarer Umgebung, betrug der Unterschied zwischen zwei Sequenzvarianten mehr als nur ein einziges Nukleotid, z. B. TEM Position 35 (GA vs. CC); SHV Positionen 140 (GGCC vs. CCGG), 192/3 (GC vs. CG) oder 167 (Insertion von 15 Nukleotiden - DRWET); AmpC Position 196 AER (CC vs. AG). In diesen Fällen wurde jeweils eine Sonde passend zur Wildtyp (WT)-Sequenz und zur Mutanten (MUT)-Sequenz entworfen (z. B. 140_{WT} and 140_{MUT}). Als Wildtyp-Sequenz wurden die Gensequenzen der jeweiligen parental Enzymvarianten verwendet, und zwar TEM-1, SHV-1 und CTX-M-1 (bzw. CTX-M-2 oder CTX-M-9 für die weiteren CTX-M-Untergruppen). Die als Wildtyp verwendete Varianten der verschiedenen Familien der plasmidkodierten AmpC Enzyme waren CMY-2 (CIT), ACC-1 (ACC), FOX-1 (FOX), MIR-1 (ENT), DHA-1 (DHA) und CMY-1 (AER). Die als Wildtyp verwendete Varianten der verschiedenen OXA-Gruppen waren OXA-10 (Gruppe I), OXA-2 (Gruppe II), OXA-23, OXA-24 und OXA-51 (Untergruppen der Gruppe V).

(III) Die Sequenzen einiger Sonden enthalten künstliche Fehlpaarungen (Mismatches) zu den Ziel-Sequenzen an Positionen, die zentrale Rollen bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen spielen (z. B. Sondensätze TEM 224), mit dem Ziel, die Stabilität dieser Strukturen zu verringern. Die hierdurch verursachte Verringerung der Hybridisierungseffektivität musste meist durch eine Verlängerung der ursprünglichen Sonde kompensiert werden. Für diese Sonden wurde die so genannte T_M -Mismatch (OligoAnalyzer) berechnet und die Länge der Sonde entsprechend dem definierten T_M -Bereich (siehe oben) angepasst.

In einigen Fällen wurden verschiedene Sonden-Entwürfe in Testhybridisierungen evaluiert und der endgültige Sondensatz unter Berücksichtigung von Perfect Match zu Mismatch Diskriminierung und Hybridisierungseffektivität ausgewählt. Die entwickelten Sonden werden in den entsprechenden Ergebnis-Kapiteln besprochen. In Kapitel 6.2 sind alle relevanten Sondensequenzen zusammengefasst.

2.2.2.3. Kontrollen

Um den korrekten Ablauf eines Microarray-Experiments zu überprüfen, wurden verschiedene Kontrollsonden verwendet: eine bereits mit Cy3 markierte Druckkontrolle (DK, 5'-TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-Cyanin3 [Cy3]-3'), eine positive Hybridisierungskontrolle (PHK, 5'-TTTTTTTTTTTTGATTGGACGAGTCAGGAGC-3') und eine negative Hybridisierungskontrolle (NHK, 5'-TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-3'). Bei der PHK handelte es sich um ein Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zur markierten Kontroll-DNA (5'-Cy3-GCTCCTGACTCGTCCAATC-3'), die zu jeder Hybridisierung zugegeben wurde. Die Sequenzen der Kontrollsonden stammten aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana*, um Kreuzhybridisierungen mit der nachzuweisenden Ziel-DNA auszuschließen. Die Druckkontrollen wurden jeweils an den Ecken, die positiven und negativen Hybridisierungskontrollen an den Rändern eines Subarrays platziert. Zusätzlich zu den beschriebenen Qualitätskontrollen wurden für die nachzuweisenden β -Lactamasegene so genannte Prozesskontrollen (PK) verwendet. Die Sequenzen dieser Prozesskontrollen entsprachen Sequenzen konservierter Bereiche der jeweiligen Ziel-Gen-Familie (TEM:

5'-TTTTTTTTTTTTTTAGAAACGCTGGTGAAAGT-3'; SHV: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGC-3'; CTX-M: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTATCGCGGT GATCTGGC-3') bzw. -Untergruppe (AmpC: siehe 6.2.2; OXA: siehe 6.2.3) und wurden als Sonden zum Gen-Nachweis verwendet. Im Layout jedes Subarrays wurden die Prozesskontrollen in je einer Linie ober- und unterhalb der zentralen SONDENSÄTZE platziert.

2.2.3 Herstellung der Oligonukleotid-Microarrays

Der integrierte TEM-, SHV- und CTX-M-Dreifach-Chip bestand aus drei Streifen von je 4 - 5 Subarrays (insgesamt 12). Jeder Streifen stellte ein Modul zur Genotypisierung von TEM-, SHV- oder CTX-M- β -Lactamasen dar. Jeder Array wurde aus 618 verschiedenen allelspezifischen Sonden, genspezifischen Sonden und Kontrollsonden gefertigt (2172 Spots). Einzelne Chipmodule zur Genotypisierung von z. B. AmpC-, OXA- oder auch TEM- β -Lactamasen wurden in einem 2 x 2 Subarray Layout gedruckt. Das AmpC-Chipmodul wurde aus 155 verschiedenen Sonden hergestellt (562 Spots), das OXA-Chipmodul aus 148 Sonden (567 Spots). Die Layouts des Dreifach-Chips, der AmpC- und OXA-Chipmodule und der verschiedenen Testchips werden zusammen mit den jeweiligen Ergebnissen ausführlich beschrieben (siehe z. B. Abbildung 3-33, Abbildung 3-42 und Abbildung 3-51).

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) in lysophilisiertem Zustand erworben (Reinheitsgrad: entsalzt, Qualitätskontrolle: MALDI-TOF) und in HPLC-Wasser zu einer Konzentration von 100 μ M gelöst. Jedes Oligonukleotid war mit einem 13-Thymidin-Spacer und einer Aminomodifikation am 5' Ende versehen. Jede allelspezifische Oligonukleotid-Sonde wurde im Triplikate auf die Epoxy-beschichtete Oberfläche der Objektträger (Nexterion Slide E; Schott, Jena, Deutschland) gedruckt. Die positiven und negativen Hybridisierungskontrollen wurden pro Subarray sechsfach (z. B. Dreifach-Chip) oder zwölffach (z. B. AmpC- und OXA-Chipmodule) gedruckt. Die verschiedenen Prozesskontrollen wurden mindestens vierfach gedruckt. Für den Druckvorgang wurden die Sonden schließlich in 1x Druckpuffer (modifizierter Nexterion Spot-Puffer, Schott, Jena, Deutschland) gelöst (Endkonzentration: 20 μ M) und mit Hilfe eines BioRobotics MicroGrid II microarrayers (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) und 4 (z. B. einzelne Chipmodule) bzw. 8 (Dreifach-Chip) Split Pins (PT3000; Point Technologies, Boulder, CO, USA) auf die Oberfläche der Objektträger übertragen. Die Luftfeuchtigkeit während des Druck-Prozesses wurde kontrolliert und lag konstant bei 54 %. Von diesem allgemeinen Prozess wurde in folgenden Fällen abgewichen: die mit Cy3 markierte Druckkontrolle wurde zu einer Endkonzentration von nur 5 μ M in Druckpuffer verdünnt und 11 verschiedene Sonden des CTX-M Chipmoduls wurden auf Endkonzentrationen von 12 - 50 μ M in Druckpuffer verdünnt. Zur kovalenten Immobilisierung der aminomodifizierten Oligonukleotide auf den Epoxy-beschichteten Glasträgern wurden die gedruckten Microarrays für 30 min bei 60 °C im Trockenschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) aufbewahrt. Vor der Hybridisierung wurden die Glasträger nacheinander für 5, 4 bzw. 10 min in Spüllösung 1, Spüllösung 2 und Spüllösung 3 inkubiert. Die Lösungen wurden durch Rühren in Bewegung gehalten. Nach kurzem Waschen (1 min) mit ddH₂O, Inkubation in Blockierungslösung für 15 min im Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 50 °C unter leichtem Schütteln und erneutem Waschen (1 min, ddH₂O) wurden die Objektträger mit Stickstoff getrocknet. Der durchschnittliche Spotdurchmesser betrug 130 μ m (ScanArray Software) und der Spot-zu-Spot-Abstand 320 μ m (TAS). Die behandelten Microarrays wurden bis auf weiteres trocken, bei Raumtemperatur und im Dunkeln für maximal 20 Tage aufbewahrt.

Zur Integration der Chipmodule wurden zunächst einige Versuche mit *Epoxy coated glass slides* (3D) der Firma Elipsa durchgeführt. Hierfür mussten die Sonden in einem entsprechenden Phosphat-Spottingpuffer gelöst werden. Die Parameter während des Druck-Prozesses, die Immobilisierung der Oligonukleotide, die Wasch-Prozedur und die Trocknung wurden analog zu den Nexterion Slide E-Objektträgern durchgeführt.

Der Wechsel von nicht-modifizierten zu aminomodifizierten TEM-Sonden wurde zum selben Zeitpunkt wie der Wechsel zu Nexterion E *Slides* vollzogen.

2.2.4 Stämme, Isolate und Empfindlichkeitstestungen

2.2.4.1. Referenzstämme

Als Referenzmaterial dienten die in 2.1.7.1 zusammengefassten Stämme, die von kooperierenden Krankenhäusern und Forschungseinrichtungen zur Verfügung gestellt wurden. Als TEM-Referenzstämme dienten ein EARSS-Referenzstamm und zwei weitere Referenzstämme des Robert Koch Instituts (RKI) in Wernigerode, ein charakterisierter *E. coli* Laborstamm des Instituts für Technische Biochemie (ITB) in Stuttgart und diverse charakterisierte klinische Isolate, gesammelt am Robert Bosch Krankenhaus (RBK) in Stuttgart. Als SHV-Referenzstämme standen einerseits *E. coli*-Stämme mit verschiedenen *bla_{SHV}* Ziel-Genen, bereitgestellt von H. Hächler vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich (ZÜR) in der Schweiz, als auch diverse charakterisierte klinische Isolate aus einem Krankenhaus in Zadar, Kroatien (KRO), zur Verfügung. Klinische Isolate aus zwei russischen Kliniken in Moskau (MOS) bzw. Tomsk (TOM) und dem Universitätsklinikum in Frankfurt (FRA) wurden als CTX-M-Referenzmaterial verwendet. Zwei OXA-Referenzstämme wurden ebenfalls vom RKI, ein weiterer vom RBK, zur Verfügung gestellt. Die DNA-Isolation aus Reinkulturen erfolgte nach Standardmethoden in der Regel an den jeweiligen Instituten oder am RBK. Weitere Referenzstämme zur Evaluierung des OXA-Chips wurden von Professor Sebastian Amyes (Arbeitsgruppe Molekulare Chemotherapie, Zentrum für Infektionskrankheiten, Edinburgh (EDI), UK) zur Verfügung gestellt. Zur DNA-Extraktion wurden Zellen einer Kulturplatte mit einer Impföse in 100 µl steriles ddH₂O suspendiert, für 15 min im Thermoblock bei 95 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. 2 µl des Kochüberstands wurden jeweils als *Template* für die darauf folgenden PCR Untersuchungen verwendet. DNA von zwei AmpC-Referenzstämmen wurde ebenfalls vom RKI in Wernigerode in Form aufgereinigter DNA (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und als Kochüberstand zur Verfügung gestellt.

2.2.4.2. Klinische Isolate

Die klinischen Isolate zur Validierung des TEM-, SHV- und CTX-M-Dreifach-Chips wurden am Robert-Bosch-Krankenhaus (Abteilung für Labormedizin, RBK, Stuttgart, n = 22) und am Universitätsklinikum der J.W. Goethe-Universität (Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene, Frankfurt am Main (FRA), n = 38) in der täglichen Routine gesammelt. Sie wurden aus Proben der Atemwege (n = 9), Abstrichen (n = 28), Urin (n = 18) und Probematerial aus anderen Lokalisationen (n = 5) gewonnen. Die Spezies-Identifikation erfolgte mit dem API 20NE System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich), der VITEK 2-Testkarte zur Identifikation gramnegativer Keime (GN) auf einem VITEK 2XL System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) oder mit Hilfe weiterer Standardmethoden gemäß den Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Alle Stämme wurden routinemäßig bei 37 °C in Columbia-Blutagar (Heipha Diagnostika, Eppelheim, Deutschland) oder Schädler-Bouillon (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers. Diese Arbeiten wurden am Robert-Bosch-Krankenhaus durchgeführt. Die Proben isolierter DNA wurden anschließend anonymisiert und nur mit einer Nummer versehen, so dass diese als Blindproben vorlagen.

2.2.4.3. Empfindlichkeitstestungen

Antibiotika-Empfindlichkeiten wurden mittels Agardiffusionstests (Antibiogramm nach Kirby-Bauer) auf Müller–Hinton Agar gemäß CLSI-Richtlinien und E-Tests (AB Biodisk, Solna, Sweden) bestimmt. Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) wurden mit Hilfe der VITEK 2-

Testkarte zur Empfindlichkeitsprüfung gramnegativer Keime (AST-N062) und einem VITEK 2XL System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ermittelt. Es wurde die Empfindlichkeit gegenüber folgenden Antibiotika getestet: Amikacin (AMK), Amoxicillin-Clavulansäure (AMC), Ampicillin (AMX), Ampicillin-Sulbactam (SAM), Aztreonam, Cefaclor (CEC), Cefazolin (CFZ), Cefepime (FEP), Cefoxitin (FOX), Cefotaxim (CTX), Cefpodoxim (CPD), Ceftazidim (CAZ), Ceftriaxon (CRO), Cefuroxim (CXM), Ciprofloxacin (CIP), Colistin, Doxycyclin (DOX), Fosfomycin (FOF), Gentamicin (GEN), Imipenem (IMP), Levofloxacin (LEV), Meropenem (MER), Mezlocillin (MEZ), Moxifloxacin (MXF), Nitrofurantion (NIT), Piperacillin (PIP), Piperacillin-Sulbactam (PIP-SUL), Piperacillin-Tazobactam (TZP), Tetracyclin (TET), Tobramycin (TOB), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT). Die relevanten phänotypischen Resistenzdaten werden in den entsprechenden Ergebnis-Kapiteln besprochen. Die Resistenzdaten wurden in Kapitel 6.4 zusammengefasst.

2.2.5 Herstellung der Ziel-DNA

2.2.5.1. Amplifizierung und Markierung

Die Ziel-DNA für die Hybridisierung wurde durch Amplifizierung der jeweiligen *bla*-Zielgene mittels PCR hergestellt. Die Markierung wurde standardmäßig durch den Einbau von Cy3-markiertem dCTP erreicht. Hierzu wurde im Reaktions-Ansatz eine 3:2-Mischung von nicht markiertem dCTP zu markiertem dCTP eingesetzt. Zur Produktion von unmarkierter DNA während eines Screenings oder zur späteren Sequenzierung wurde kein Cy3-dCTP eingesetzt, sondern stattdessen nur nicht markiertes dCTP. Die jeweils relevanten Kontrollreaktionen (z. B. Negativkontrollen mit keinem DNA-*Template* oder Positivkontrollen mit bekanntem Referenz-*Template*) waren in jedem PCR-Programmablauf enthalten. Tabelle 2-1 fasst die Primer, die letztendlich für die Amplifikation verwendet wurden, zusammen. Zusätzliche Primer, die während der Etablierung eines PCR-Regimes eingesetzt wurden, werden in den entsprechenden Ergebniskapiteln beschrieben.

(I) TEM- und SHV- β -Lactamasen: Die *bla*_{TEM}- und *bla*_{SHV}-Gene wurden standardmäßig gleichzeitig in einer Dualplex-PCR mit den Primern TEM-forw, TEM-rev, SHV-forw und SHV-rev vervielfältigt. Die Amplikongrößen betragen 861 (TEM) bzw. 932 (SHV) Basenpaare. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet: 50 ng Plasmid-DNA-*Template*, jeweils 0,4 μ M Primer, jeweils 100 μ M dATP, dGTP und dTTP, 60 μ M dCTP, 40 μ M Cy3-dCTP, 2,5 mM Mg²⁺, 2 % DMSO, 5 U *Taq*-Polymerase und 1x *Taq*-Puffer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Endvolumen: 50 μ l. Die Amplifizierung wurde mit folgendem Temperaturprofil in einem Mastercycler ep gradient bzw. Mastercycler ep gradient S durchgeführt: 1 min Denaturierung bei 94 °C; 30 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C (Denaturierung), 30 s bei 54 °C (Primeranlagerung) und 1 min bei 68 °C (Verlängerung der Primer); 4 min abschließende Verlängerung bei 68 °C. Die getrennte Amplifikation (z. B. zur späteren Sequenzierung) von *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} erfolgte mit identischen Parametern, jedoch nur mit dem einen relevanten Primerpaar. Die Gesamtdauer betrug 87 min (ep gradient) bzw. 73 min (ep gradient S).

(II) CTX-M- β -Lactamasen: Zur Detektion von *bla*_{CTX-M}-Genen wurde zunächst eine Multiplex-PCR mit unterschiedlichen Primern für die verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Gruppen durchgeführt. Die eingesetzten Primerpaare wurden bereits von Woodford und Kollegen beschrieben (Woodford et al. 2006b) und führten zu unterschiedlichen Amplikongrößen für die verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Gruppen mit 415 (M1-Gruppe), 552 (M2-Gruppe), 666 (M8-Gruppe), 205 (M9-Gruppe) und 327 Basenpaaren (M25-Gruppe). Zur Amplifikation wurden 2 μ l Plasmid-DNA-Lösung mit den verschiedenen Primern (jeweils 0,2 μ M, außer jeweils 0,4 μ M für die Primer der M9 Gruppe) und QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, welcher optimierte Konzentrationen an HotStarTaq DNA Polymerase, Mg²⁺, dNTPs und Reaktionspuffer enthält, in einem Endvolumen von 50 μ l gemischt. Einem Aktivierungsschritt für 15 min bei 95 °C folgten 35 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C, 90 s bei 60 °C und 1 min bei 72 °C und ein letzter Verlängerungsschritt für 10 min bei 72 °C. Zur Produktion der Ziel-DNA wurden die

nachgewiesenen Gene anschließend separat mit den zur jeweiligen CTX-M-Gruppe zugehörigen Primern (Eckert et al. 2006) amplifiziert und markiert. Die Amplikongrößen betragen 864 (M1-Gruppe), 866 (M2-Gruppe) bzw. 870 (M9-Gruppe) Basenpaare. Die Vervielfältigung wurde im Mastercycler ep gradient oder Mastercycler ep gradient S nach dem Protokoll zur Amplifizierung der *bla*_{TEM}- und *bla*_{SHV}-Gene durchgeführt, jedoch mit folgenden Änderungen des Reaktionsansatzes bzw. des Temperaturprofils: 3 µl *Template*; Primer-Konzentration, jeweils 0,2 µM; Primeranlagerung (Annealing), 60 °C, *Taq*-Polymerase (Eppendorf) oder Platinum *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen).

(III) Plasmidkodierte AmpC-β-Lactamasen: Gene der *Citrobacter freundii* (CIT)-Gruppe der plasmidkodierten AmpC-β-Lactamasen (*bla*_{CMY-2}-ähnliche Gene) wurden mit den Primern CIT-forw₃₇ und CIT-rev amplifiziert. Es wurde ebenfalls das PCR-Protokoll zur Vervielfältigung der *bla*_{TEM} und/oder *bla*_{SHV} Gene verwendet. Als *Template* wurden entweder 5 µl Kochüberstand einer Zellsuspension oder 150 ng aufgereinigte DNA (Gesamt-DNA) verwendet.

(IV) OXA-β-Lactamasen: Zur Amplifikation der Gene der verschiedenen Untergruppen der Gruppe V der OXA β-Lactamasen wurden unterschiedliche Primer verwendet. Die *bla*_{OXA-51}-ähnlichen Gene wurden mit den von Heritier und Kollegen (Heritier et al. 2005) beschriebenen Primern OXA-69 forw und OXA-69 rev vervielfältigt. Die Amplikongröße betrug 975 bp. Für die Standard-PCR ohne Markierung des PCR-Produktes wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 2 µl Kochüberstand einer Zellsuspension als *Template*, jeweils 0,4 µM Primer, jeweils 200 µM dATP, dGTP, dTTP und dCTP, 2,5 mM Mg²⁺, 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase und 1x Reaktionspuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), Endvolumen: 50 µl. Für den Markierungs-PCR-Ansatz wurden nur 100 µM dNTPs eingesetzt: jeweils 100 µM dATP, dGTP und dTTP, 60 µM dCTP, 40 µM Cy3-dCTP. Beide Reaktionen wurden in einem PTC-150 MiniCycler (MJ Research, Waltham, USA) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 15 min Aktivierung bei 95 °C, 30 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94 °C, 40 s bei 48 °C und 3 min bei 72 °C, abschließende Verlängerung für 6 min bei 72 °C. Für alle vier Untergruppen standen die für eine Multiplex PCR entwickelten Primer von Woodford und Kollegen (Woodford et al. 2006a) zur Verfügung (in Tabelle 2-1 z. B. als OXA-XY multi bezeichnet). Diese wurden zum Screening einiger klinischer Isolate verwendet, jedoch in getrennten PCR-Reaktionen. Hierfür wurde das gleiche Protokoll verwendet wie für die Standard-Amplifizierung der *bla*_{OXA-51}-ähnlichen Gene. Für die Primeranlagerung wurde jedoch eine Temperatur von 52 °C verwendet. Die Herstellung der Ziel-DNA der *bla*_{OXA-23}- bzw. *bla*_{OXA-24}-ähnlichen Gene wurde analog zur Markierungs-PCR der *bla*_{OXA-51}-ähnlichen Gene mit den Primerpaaren OXA-23 forw und OXA-23 rev bzw. OXA-24 forw und rev und einer Annealing-Temperatur von 52 °C durchgeführt.

Die Amplifizierung der Zielgene wurde durch Analyse der PCR-Produkte auf einem 1,5 %-igen Agarosegel (40 min bei 100 V) bestätigt.

Tabelle 2-1: Primer zur Amplifikation verschiedener β-Lactamasegene

Zielgen	Primernamen ¹	Primersequenz (5'-3')	Referenz
TEM-β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-forw	TGAGTATTCAACATTTCCGTGT	(Grimm 2005)
	TEM-rev	TTACCAATGCTTAATCAGTGA	
SHV-β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-forw	CAAACGCCGGTTATTC	diese Arbeit
	SHV-rev	TTAGCGTTGCCAGTGCT	
CTX-M- β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -ähnlich	CTX-M1-forw	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	(Eckert et al. 2006)

Material und Methoden

Zielgen	Primernamen ¹	Primersequenz (5'-3')	Referenz
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -ähnlich	CTX-M1-rev	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	diese Arbeit ²
<i>bla</i> _{CTX-M-2} -ähnlich	CTX-M2-forw	ATGATGACTCAGAGCATTCCG	diese Arbeit ²
	CTX-M2-rev	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9-forw	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	diese Arbeit ²
	CTX-M9-rev	CCCTTCGGCGATGATTCTCG	
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -ähnlich	CTX-M1 multi forw	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	(Woodford et al. 2006b)
	CTX-M1 multi rev	AGCTTATTTCATCGCCACGTT	
<i>bla</i> _{CTX-M-2} -ähnlich	CTX-M2 multi forw	CGACGCTACCCCTGCTATT	(Woodford et al. 2006b)
	CTX-M2 multi rev	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	
<i>bla</i> _{CTX-M-8} -ähnlich	CTX-M8 multi forw	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	(Woodford et al. 2006b)
	CTX-M8 multi rev	AACCCACGATGTGGGTAGC	
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9 multi forw	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	(Woodford et al. 2006b)
	CTX-M9 multi rev	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	
<i>bla</i> _{CTX-M-25} -ähnlich	CTX-M26 multi forw	GCACGATGACATTCGGG	(Woodford et al. 2006b)
	CTX-M26 multi rev	AACCCACGATGTGGGTAGC	
Plasmidkodierte AmpC-β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{CMY-2} -ähnlich	CIT-forw ₃₇	CGGACACCTTTTTGCTTTTAATT	diese Arbeit ³
<i>C. freundii</i> (CIT) - Gruppe	CIT-rev	GAAAAAAGAGAAAGAAAGGAGGC	(Perez-Perez und Hanson 2002)
	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
OXA β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{OXA-51} -ähnlich (Gr. V Untergr. 3)	OXA-69 forw	CTAATAATTGATCTACTCAAG	(Heritier et al. 2005)
	OXA-69 rev	CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC	
<i>bla</i> _{OXA-23} -ähnlich (Gr. V Untergr. 2)	OXA-23 forw	CTTCTCTTTTTCTTCTGGTTGTA	diese Arbeit
	OXA-23 rev	ATTTCTGACCGCATTTCCA	
<i>bla</i> _{OXA-24} -ähnlich (Gr. V Untergr. 1)	OXA-24 forw	TAGAAAATCATAAAGCAACAACAAATG	diese Arbeit
	OXA-24 rev	ATTATTAATGATTCCAAGATTTTCTAGC	
<i>bla</i> _{OXA-51} -ähnlich (Gr. V Untergr. 3)	OXA-51 multi forw	TAATGCTTTGATCGGCCCTTG	(Woodford et al. 2006a)
	OXA-51 multi rev	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
<i>bla</i> _{OXA-23} -ähnlich (Gr. V Untergr. 2)	OXA-23 multi forw	GATCGGATTGGAGAACCAGA	(Woodford et al. 2006a)
	OXA-23 multi rev	ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
<i>bla</i> _{OXA-24} -ähnlich (Gr. V Untergr. 1)	OXA-24 multi forw	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	(Woodford et al. 2006a)
	OXA-24 multi rev	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
<i>bla</i> _{OXA-58} -ähnlich (Gr. V Untergr. 4)	OXA-58 multi forw	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	(Woodford et al. 2006a)
	OXA-58 multi rev	CCCTCTGCGCTCTACATAC	

¹ Nummern im Primernamen beschreiben Position des 5' Primerendes bezüglich des Startcodons

² angepasste Primer aus Eckert et al. (Eckert et al. 2006).

³ überarbeitete Primer aus Alvarez et al. (Alvarez et al. 2004).

2.2.5.2. Aufreinigung, Konzentrationsbestimmung und Einbaurate

Die Aufreinigung des PCR-Produkts mittels QIAquick Spin PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte nach Protokoll des Herstellers, wobei die DNA mit 30 µl HPLC-H₂O eluiert wurde. Anschließend wurden die Massenkonzentration der DNA, β_{DNA} [ng/µl] und die Molarität des eingebauten Cy3-Farbstoffs c_{Cy3} [pmol/µl] durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bzw. 550 nm mit einem Spektrophotometer (ND-1000 Spectrophotometer; NanoDrop

Technologies, Rockland, Maine) bestimmt. Für eine Messung wurden 1,5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts benötigt. Gegebenenfalls wurde die Ausbeute als Gesamtmenge der enthaltenen DNA mit Formel (1) berechnet:

$$\text{Ausbeute} = \beta_{\text{DNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] \times V_{\text{Eluat}} [\mu\text{l}] \quad (1)$$

Die Einbaurrate von Cy3-dCTP in die DNA wurde als Anzahl Nukleotide (NT) / eingebautes Cy3-dCTP definiert und mit Formel (2) berechnet:

$$\text{Einbaurrate} = n_{\text{NT}} / n_{\text{Cy3}}$$

$$\text{mit konstantem Volumen } V_{\text{LSG}}: c_{\text{DNA}} / c_{\text{Cy3}} = (\beta_{\text{DNA}} / M_{\text{NT}}) / c_{\text{Cy3}}$$

$$\text{unter Berücksichtigung der Einheiten für } \beta_{\text{DNA}} \text{ und } c_{\text{Cy3}}: (\beta_{\text{DNA}} / M_{\text{NT}}) \times 1000 / c_{\text{Cy3}} \quad (2)$$

$$M_{\text{NT}} = \text{gemittelttes Molekulargewichts eines Nukleotids} = 330 \text{ g/mol}$$

Aufgrund dieser Definition besitzt stark markierte DNA eine niedrige Einbaurrate, schwächer markierte DNA jedoch eine höhere Einbaurrate.

2.2.6 Prozessierung der Ziel-DNA

Um die Effektivität der Hybridisierung zu steigern, wurde fluoreszenzmarkierte Ziel-DNA für die Hybridisierung auf zwei Chips (Duplikate) nach der Aufreinigung unspezifisch mit DNase I (Promega, Mannheim, Deutschland) verdaut. Hierbei wurden alle Ziel-DNA-Moleküle, die zusammen analysiert werden sollten und zum Teil in verschiedenen Markierungs-PCRs produziert wurden, in derselben Reaktion fragmentiert. Standardmäßig wurden 0,4 mU DNase I per Nanogramm DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde in 1x DNase-Puffer und in einem Volumen von 20 - 30 µl (in Abhängigkeit von den Konzentrationen der aufgereinigten PCR-Produkte) für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend durch Zugabe von 2 mM EGTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt. Für die Abschätzung der Fragmentgrößen wurde 1 µl fragmentierte DNA mittels Lab-on-a-chip-Elektrophorese (Bioanalyzer 2100, DNA 1000 LabChip kit; Agilent, Böblingen, Deutschland) analysiert. Die Aktivität des verwendeten Enzyms wurde regelmäßig und mit Hilfe von Enzym-Verdünnungsreihen und Test-Reaktionen überprüft.

2.2.7 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden folgende Mengen fragmentierte und markierte Ziel-DNA eingesetzt: (1) Testhybridisierungen mit TEM-, SHV- oder CTX-M-Referenzmaterial oder Kombinationen: 100 ng jedes verwendeten Lactamasegens, (2) Evaluierung des AmpC-Chipmoduls mit Referenzmaterial: 150 ng, (3) Validierung des OXA-Chipmoduls: 200 ng, (4) Validierung des Dreifach-Chips mit klinischen Isolaten: 150 bzw. 200 ng Produkt der TEM/SHV-Dualplex-PCR und 150 ng der CTX-M-PCR. Die Ziel-DNA wurde mit 0,05 pmol markierter Kontroll-DNA (5'-Cy3-GCTCCTGACTCGTCCAATC-3') gemischt und abhängig von der Hybridisierungsmethode (automatisch vs. manuell) in 65 µl bzw. 70 µl einer SDS-haltigen SSPE-Lösung verdünnt. Während der Assayoptimierung wurden unterschiedliche SSPE-Konzentrationen (2x oder 6x), SDS-Konzentrationen (0 – 7 %) und Hybridisierungstemperaturen (45 – 51 °C) getestet. Wenn nicht genauer angegeben, wurden standardmäßig folgende Bedingungen verwendet: 2x SSPE, 0,1 % SDS, 47 °C, 1 h.

(I) Manuelle Hybridisierung: Für die manuelle Hybridisierung wurden 70 µl Hybridisierungsansatz innerhalb eines 15 x 16 mm großen *Gene Frames* (Abgene, Hamburg, Deutschland) auf den Array aufgetragen und der durch den *Gene Frame*

entstandene Reaktionsraum mit einem entsprechenden *Cover Slip* verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte in einem speziellen Thermoblock für Objektträger (*Slide-Adapter*) eines Thermomixers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 1200 rpm. Nach der Hybridisierung wurden die Gene Frames entfernt und die Glasträger nacheinander für jeweils 10 min bei Raumtemperatur in Waschlösung 1, Waschlösung 2 und Waschlösung 3 inkubiert, wobei die Lösungen durch Rühren in Bewegung gehalten wurden. Anschließend wurden die Glasträger mit Stickstoff getrocknet.

(II) Automatisierte Hybridisierung: Bei der Hybridisierung mit Hilfe der HS 400 Hybridisierungsstation (Tecan, Crailsheim, Deutschland) wurde zunächst ein Waschschrift bei Hybridisierungstemperatur (z. B. 47 °C) mit SSPE-Puffer (gleiche Puffer-Konzentration wie für die Hybridisierung, z. B. 2x) durchgeführt. Anschließend folgte die Injektion von 65 µl Hybridisierungslösung, die Hybridisierung bei einer bestimmten Temperatur und starker Durchmischung (high agitation frequency) für 1 h, zwei Waschzyklen (jeweils 1,5 min mit Waschlösung 1 und Waschlösung 3) bei Raumtemperatur und das Trocknen der Glasträger mit Stickstoff bei 30 °C für 4 min. Die Dauer der gesamten Prozedur betrug ca. 90 min.

2.2.8 Quantifizierung

Nach der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzsignale auf dem Oligonukleotid-Array mit einem ScanArray Express Laserscanner (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) erfasst. Die Stärke des Anregungslasers (532 nm) betrug 90 oder 100 %. Jeder Chip wurde mit verschiedenen PMT-Einstellungen, u. a. 55, 60, 65 und 70 % und einer Auflösung von 10 µm gescannt (Ergebnis: 16-bit TIF-Bild). Für die Microarray-Experimente, die an der Universität Edinburgh durchgeführt wurden (insbesondere die Validierung des OXA-Chipmoduls), stand ein LS Reloaded Laserscanner (Tecan, Crailsheim, Deutschland) zur Verfügung, dessen Steuersoftware eine andere Skala für die Verstärkung mittels PMT verwendete als die ScanArray Express Steuersoftware. Daher wurden PMT-Einstellungen zwischen 140 und 170 % verwendet. Die Quantifizierung der Intensitäten der einzelnen Spots des Arrays (codiert in den 65536 Graustufen des TIF-Bildes) wurde mit der ScanArray Express Software (Version 3.0, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt, wobei die Adaptive Circle Quantifizierungsmethode verwendet wurde. ScanArray Express gibt die Rohdaten in Form einer Tabelle als .csv-Datei aus. Darin bereits enthalten sind die Nettosignalintensitäten der einzelnen Spots (NI) für deren Berechnung vom Mittelwert der Intensitäten der Pixel eines Spots der Median der Pixel des lokalen Hintergrunds abgezogen wurde.

2.2.9 Datenverarbeitung

Zur weiteren automatischen Datenverarbeitung wurden die Nettosignalintensitäten in Microsoft Excel (Microsoft, Richmond, Virginia, USA) importiert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Standard-Datenverarbeitung (Abbildung 2-1 a) mit Daten aus Scans, die mit einer PMT-Einstellung von 60 % durchgeführt wurden, wie folgt: Bei Spots, die ein nicht signifikant anderes Signal als der Hintergrund zeigten, konnte die Subtraktion des lokalen Hintergrunds zu negativen Nettosignalintensitäten führen, die theoretisch nicht existieren. Daher wurden alle negativen Nettosignalintensitäten auf 0 gesetzt. Zur graphischen Darstellung der absoluten Signalintensitäten (I) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Nettointensitäten von insgesamt sechs Spotreplikaten einer Sonde auf zwei identisch prozessierten Microarrays (jeweils Triplikate, technische Replikate) berechnet. Innerhalb jedes Sondensets wurde die Sonde mit der höchsten Signalintensität als potentiell Perfect Match (PM) bezeichnet und entsprechend diese Signalintensität als I_{PM} . Die restlichen Sonden des Sondensatzes wurden jeweils als Mismatch (MM) bezeichnet und deren Signalintensitäten als I_{MM} . Die Qualität eines Sondensatzes spiegelt sich in der Diskriminierung zwischen PM und MM wider und damit im Unterschied zwischen I_{PM} und I_{MM} .

Es wurde daher eine Normalisierung durchgeführt, wobei die Nettosignalintensitäten (NI) jedes Spots einer bestimmten Sonde des Sondensatzes durch die mittlere Signalintensität des PM dividiert wurde (NI/I_{PM}). Diese Werte wurden als relative Intensität eines Spots bezeichnet (RI_{SPOT}). Zur graphischen Darstellung der relativen Signalintensitäten (RI oder RI_{MW}), wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Spotintensitäten der sechs technischen Replikate berechnet. Dadurch resultiert für die PM Sonde ein RI von 1 ($RI_{PM}=1$), für die MM Sonden RI-Werte von kleiner 1 ($RI_{MM} < 1$).

Eine abweichende Datenverarbeitung (Abbildung 2-1 b) wurde bei der Evaluierung der Leistungsfähigkeit der einzelnen Sondensätze des Dreifach-Chips angewandt. Hierfür wurde, anstelle des Mittelwertes, der Median der Nettointensitäten der sechs technischen Replikate einer Sonde berechnet. Der so berechnete I_{PM} wurde zur Berechnung der relativen Signalintensitäten jedes Spotreplikats einer Sonde (RI_{SPOT}) verwendet. Der Median dieser Werte wurde berechnet und als RI_{MEDIAN} bezeichnet. Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichungen der RI_{MEDIAN} -Werte verschiedener Experimentwiederholungen („biologische“ Replikate) berechnet. Diese Werte wurden in den entsprechenden graphischen Darstellungen ebenfalls als relative Signale (RI) bezeichnet. Für die Analyse der TEM-Sondensätze wurden 38 Hybridisierungen mit TEM-1 Ziel-DNA ausgewertet, für die SHV-Sondensätze 10 Experimente mit SHV-1 und für die CTX-M-Sondensätze 34 Hybridisierungen mit CTX-M-15 bzw. 3 - 8 mit CTX-M-14 oder -M-9. Abbildung 2-1 zeigt den schematischen Ablauf der verschiedenen Datenverarbeitungs-Operationen. Die Abbildung beschreibt zusätzlich, an welcher Stelle des Ablaufs ein *Cut-Off* angewendet werden konnte.

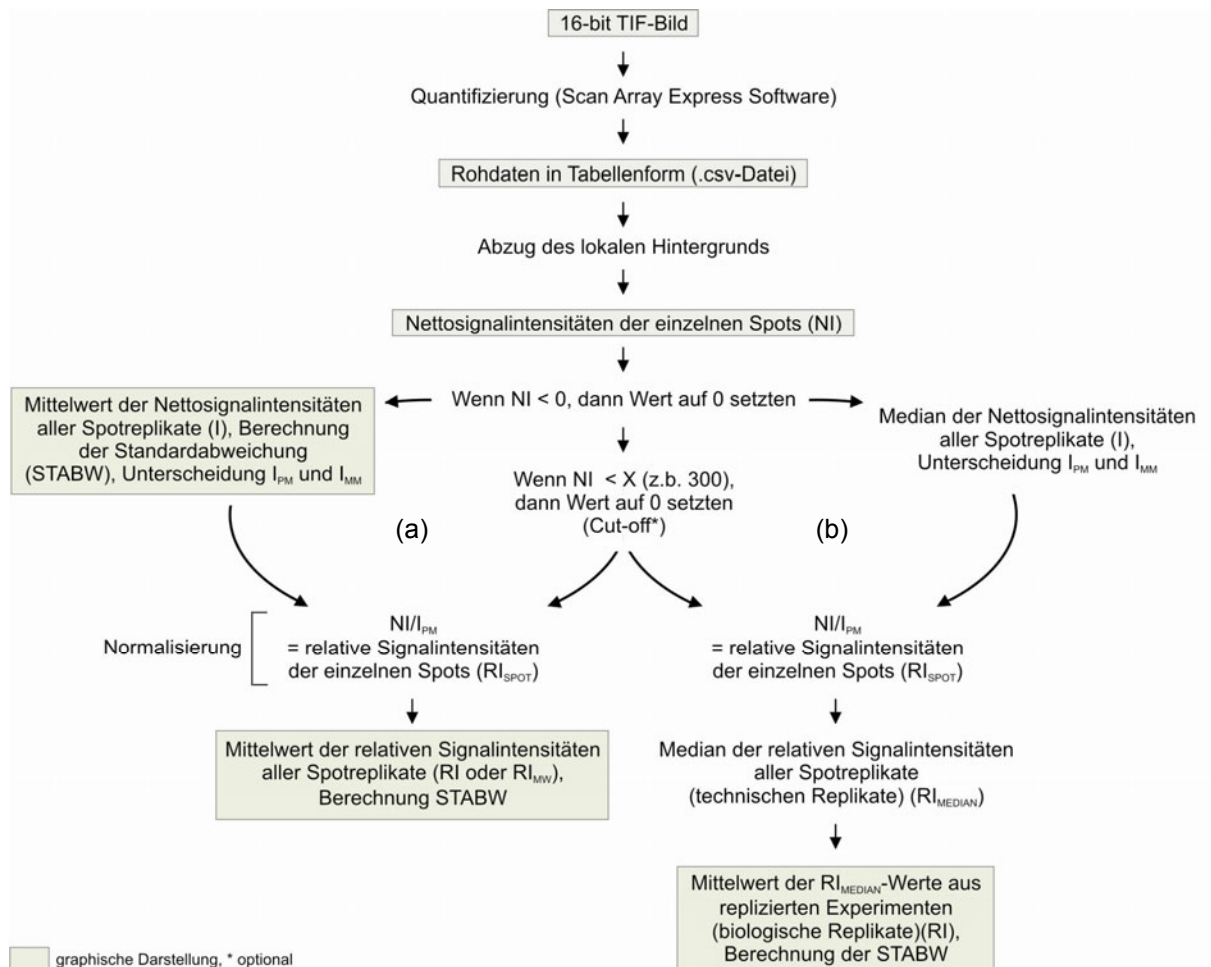


Abbildung 2-1: Schematischer Ablauf der Datenverarbeitung. (a) Standard-Datenverarbeitung, (b) alternative Datenverarbeitung.

Bei der Analyse der Signalcharakteristik der relevanten Sonden bei Mischungen wurden zusätzlich zu den Standardabweichungen die 95 % Konfidenzintervalle (KI_{95}) der RI_{MEDIAN} -Werte berechnet. Zum Vergleich des gleichen Experiments bei unterschiedlichen Hybridisierungsbedingungen oder zur allgemeinen Beurteilung eines Experimentes wurde für jeden Array die mittlere Signalintensität aller Perfect Matches (mI_{PM}) bzw. aller Mismatches (mI_{MM}) und die mittlere relative Intensität mRI als Durchschnitt aller RI_{MM} -Werte berechnet. Die 3D-Darstellung der Spotintensitäten zur optischen Einschätzung der Intensitätsverteilungen innerhalb eines Spots wurde mittels der Software ICS-501 Image Capture durchgeführt.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung der verschiedenen β -Lactamasegene wurden diese in getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Hierfür wurden dieselben Primer (TEM-forw und TEM-rev; SHV-forw und SHV-rev; CTX-M Gruppen-spezifische Primerpaare, CIT-forw₃₇ und CIT-rev) und Reaktionsbedingungen verwendet wie für die Produktion der jeweiligen Ziel-DNA. Im Gegensatz zu den beschriebenen Markierungs-PCR-Ansätzen wurde jedoch kein Cy3-dCTP eingesetzt, sondern stattdessen 100 μM nicht markiertes dCTP. Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick Spin PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und die DNA in 30 μl ddH₂O eluiert. Tabelle 2-2 fasst die Primer, die für Sequenzierung der verschiedenen *bla*-Gene verwendet wurden, zusammen. Der Einsatz von vier Primern (je zwei Vorwärts- und Rückwärtsprimer) für jedes *bla*-Gen führte zu vier sich überlappenden Sequenzen, die mit Hilfe der SeqMan II - Software (Version 5.00, DNASTar, Madison, USA) überlagert wurden. Die daraus resultierende Redundanz führte zu sicheren Sequenzierungsergebnissen. Die Sequenzierung des Referenzmaterials, insbesondere des AmpC-Referenzmaterials, wurde wie unten beschrieben am Institut für Technische Biochemie (Universität Stuttgart) durchgeführt. Die detektierten β -Lactamasegene der 60 klinischen Isolate zur Validierung des Dreifach-Chips wurden von GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert und öffentlich zugänglich gemacht (GenBank Accession Nummern FJ668714-FJ668818, siehe 6.5).

Tabelle 2-2: Primer zur Sequenzierung verschiedener β -Lactamasegene

Zielgen	Primernamen ¹	Primersequenz (5'-3')	Referenz
TEM- β -Lactamasen			
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-forw	siehe Tabelle 2.1	(Grimm 2005)
	TEM-rev	siehe Tabelle 2.1	
	TEMseq-forw	GCCAACCTTACTTCTGACAAC	diese Arbeit
	TEMseq-rev	GTTGTCAGAAGTAAGTTGGC	
SHV- β -Lactamasen			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-forw	siehe Tabelle 2.1	(Grimm 2005)
	SHV-rev	siehe Tabelle 2.1	
	SHVseq-forw	GGATTGACTGCCTTTTTTGC	diese Arbeit
	SHVseq-rev	GCAAAAAGGCAGTCAATCC	
CTX-M- β -Lactamasen			
<i>bla</i> _{CTX-M-1-ähnlich}	CTX-M1-forw	siehe Tabelle 2.1	(Eckert et al. 2006)
	CTX-M1-rev	siehe Tabelle 2.1	diese Arbeit ²
	CTX-M1seq-forw	GCGATGTGCAGCACCAGTAA	diese Arbeit
	CTX-M1seq-rev	AGCTTATTCATCGCCACGTT	
<i>bla</i> _{CTX-M-9-ähnlich}	CTX-M9-forw	siehe Tabelle 2.1	diese Arbeit ²

Zielgen	Primername ¹	Primersequenz (5'-3')	Referenz
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9-rev	siehe Tabelle 2.1	
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9seq-forw	CCAATGTGCAGTACCAGTAA	diese Arbeit
	CTX-M9seq-rev	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	
Plasmidkodierte AmpC-β-Lactamasen			
<i>bla</i> _{CMY-2} -ähnlich	CIT-forw ₃₇	siehe Tabelle 2.1	diese Arbeit ³
<i>C. freundii</i> (CIT) - Gruppe	CIT-rev	siehe Tabelle 2.1	
	CITseq-forw	GAATGAGTTACGAAGAGGCAAT	diese Arbeit
	CITseq-rev	AATCTTTTGTTCGTTCTGCG	

¹ Nummern im Primernamen beschreiben Position des 5' Primerendes bezüglich des Startcodons

² angepasste Primer aus Eckert et al. (Eckert et al. 2006).

³ überarbeitete Primer aus Alvarez et al. (Alvarez et al. 2004).

Die Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger et al. 1977) mit Hilfe des ABI Prism 377-DNA-Sequencers (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Für die Reaktionsansätze wurde das Big-dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet, welches die AmpliTaq-DNA-Polymerase, die benötigten Salze, Puffer, dNTPs und vier unterschiedlich fluoreszenz-markierte ddNTPs enthielt. Der Einbau dieser Terminatoren führte zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen. Die bei der Sequenzier-Reaktion entstandenen, unterschiedlich fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden schließlich in eine Spur eines Polyacrylamidgels aufgetragen. Die zu einer PCR analoge, zyklische Sequenzier-Reaktion erfolgte im Master Cycler Gradient, Mastercycler ep gradient oder Mastercycler ep gradient S Thermocycler nach folgenden Parametern: 200 ng aufgereinigte DNA wurde in einem Endvolumen von 20 µl mit 0,4 µM Primer (relevanter Vorwärts- oder Rückwärtsprimer) und 4 µl des BigDye Terminator cycle sequencing reaction mix gemischt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 4 min bei 94 °C; 25 Zyklen mit jeweils 40 s bei 94 °C, 30 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C; 4 min bei 60 °C.

Die Reinigung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch Gelfiltration. Eine Sephadex G50 Matrix wurde mit einem Glasschaber in den Kavitäten einer Multititerplatte (MAHV N45) verteilt und durch Inkubation mit 300 µL H₂O je Kavität für drei Stunden zum Quellen gebracht. Nach Auftragen der Probe auf die gequollene Matrix wurde die DNA durch Zentrifugation eluiert. Das DNA-Pellet wurde für zwei Stunden getrocknet und anschließend in 3,5 µL einer 4:1 Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA (pH 8) resuspendiert. Zur Herstellung des Polyacrylamidgel wurden 30 g Harnstoff in 6 ml Rotiphorese NF-10x-TBE-Puffer, 9 ml Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1) für automatische Sequenzierung und 23,5 ml H₂O gelöst und die fertige Lösung durch einen Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und entgast. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 24 µL TEMED und 180 µL 10 % (m/v) APS gestartet. Zur Analyse wurde 1 µL dieser Lösung auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auswertung des Gelbildes erfolgte mit der ABI Prism 377-Software (Version 3.2, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Für die weitere Datenverarbeitung standen die Sequenzen im .abi- und .seq-Datei-Format zur Verfügung.

3. Ergebnisse

3.1. ESBL-Microarray – TEM-, SHV- und CTX-M- β -Lactamasen

Für die Entwicklung eines integrierten ESBL-Microarrays zur parallelen Genotypisierung von β -Lactamasen des TEM-, SHV- und CTX-M-Typs auf der Basis der am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart entwickelten TEM-, SHV- und CTX-M-Microarrayprototypen, wurden verschiedene Themenkomplexe der Assay- und Microarrayentwicklung bearbeitet. Die Arbeiten zur Etablierung der Amplifizierung der *bla*-Gene (siehe 3.1.1) und Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für den gesamten Satz an Oligonukleotidsonden (siehe 3.1.2) beschäftigten sich mit Aspekten des Assays. Die in den Abschnitten zur Integration (siehe 3.1.3) und Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule (siehe 3.1.4) zusammengefassten Arbeiten, behandelten Aspekte der Microarrayentwicklung, wie z. B. die technische Integration mehrere Chipmodule, Sondendesign bzw. -Redesign und Erweiterung der Chipmodule zur Identifikation neu beschriebener *bla*-Allele. Für die Validierung des ESBL-Microarrays (siehe 3.1.5) mit 60 klinischen Isolaten wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen kombiniert. Abbildung 3-1 zeigt eine Übersicht über die Themenkomplexe zur Entwicklung des ESBL-Microarrays und kennzeichnet mögliche Rückkopplungen und Wechselwirkungen.

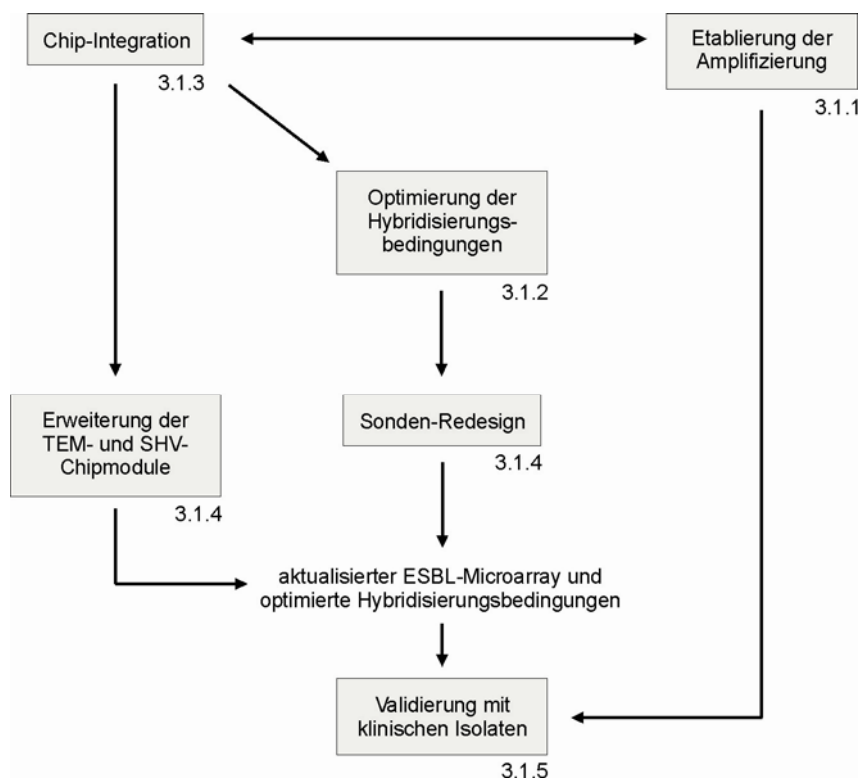


Abbildung 3-1: Übersicht über die Themenkomplexe zur Entwicklung des ESBL-Microarrays. Die Nummern bezeichnen Kapitel dieser Arbeit.

3.1.1 PCR-Etablierung

Die Ziel-DNA für die Hybridisierung wurde mittels PCR hergestellt. Für einen Assay zur gleichzeitigen Genotypisierung verschiedener β -Lactamasegene ist eine Methode, die die unterschiedlichen *Targets* in einem einzigen Schritt amplifiziert, wünschenswert. Dadurch können Zeit, Arbeitsaufwand und letztendlich Kosten gespart werden. In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Amplifikationsstrategien entwickelt, die eine wirtschaftliche, sensitive und robuste Detektion der Resistenzgene und die Bereitstellung von Ziel-DNA für die anschließende Hybridisierung gewährleisten.

3.1.1.1. Amplifizierung von bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M}

(1) TEM/SHV-Dualplex-PCR: Parallel zur Integration der TEM- und SHV-Microarrayprototypen (siehe 3.1.3) wurde auch die Amplifikation dieser beiden *bla*-Gene zusammengefasst. Zur Etablierung einer Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Vervielfältigung von bla_{TEM} und bla_{SHV} wurden zunächst die in den Arbeiten von Verena Grimm (Grimm et al. 2004; Grimm 2005) beschriebenen TEM- und SHV-Primer verwendet. Für die Dualplex-PCR wurde das Protokoll der bla_{SHV} -PCR verwendet, welches in zwei Punkten nicht mit dem bla_{TEM} -Protokoll übereinstimmte. (I) Für die SHV-Primer wurde eine um ein Grad niedrigere Primeranlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur, T_A) (54 °C im Vergleich zu 55 °C) und (II) eine längere Dauer der PCR-Zyklen verwendet (Denaturierung und Annealing jeweils 1 min im Vergleich zu jeweils 30s). Die Primerpaare waren unter diesen Bedingungen perfekt kompatibel und lieferten in Standard- und Markierungs-PCR-Reaktionen die spezifischen PCR-Produkte (TEM, 861 bp; SHV, 932 bp). Abbildung 3-14 a zeigt exemplarisch das Ergebnis einer TEM/SHV Dualplex Markierungs-PCR zur Amplifizierung von $bla_{TEM-116}$ und bla_{SHV-2} . Sowohl bei der gleichzeitigen als auch bei der einzelnen Amplifikation der *bla*-Gene wurden keine Nebenprodukte detektiert. Die gleichzeitige Vervielfältigung von $bla_{TEM-116}$ und bla_{SHV-2} lieferte markierte Ziel-DNA mit einer Einbaurate von 88 NT/Cy3. Diese konnte erfolgreich für die Hybridisierung eingesetzt werden (siehe Abbildung 3-14 b).

(2) TEM/SHV/CTX-M-Multiplex-PCR: Zur Etablierung einer Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation aller drei *bla*-Gene wurden der beschriebenen TEM/SHV-Dualplex-PCR CTX-M-spezifische Primer hinzugefügt. Die CTX-M- β -Lactamasen werden in die fünf Gruppen M1, M2, M8, M9 und M25 eingeteilt. Für die Amplifikation verschiedener bla_{CTX-M} -Allele der unterschiedlichen Gruppen wurden Gruppen-spezifische Primerpaare eingesetzt. Die Sequenzen dieser Primer wurden von Maya Rubtsova von der Chemischen Fakultät der M. V. Lomonosov Moscow State University in Moskau, Russland, zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Sie wurden zuvor zur Etablierung des CTX-M-Microarray-Prototyps eingesetzt. Die unveränderten Sequenzen wurden mit der Bezeichnung „original“ versehen. Die Schmelztemperaturen (T_M) der CTX-M-Primer betragen zwischen 49,2 °C und 61,1 °C. Der Unterschied zwischen T_M s einzelner Primer betrug bis zu 11,9 °C. Die durchschnittliche T_M betrug 56 °C und lag 1,7 °C über der durchschnittlichen T_M der TEM- und SHV-Primer (54,3 °C). Für die CTX-M-Primer wurde am NRCA eine optimale Annealing-Temperatur von 58 °C ermittelt. Die Dauer der PCR-Zyklen entsprach den Zeiten der TEM/SHV-Dualplex-PCR. In einer Test-PCR mit $T_A = 54$ °C lieferten die einzelnen Primerpaare keine spezifischen Produkte, aber viele unspezifische Nebenprodukte. Eine direkte Integration der CTX-M-Primer in die mit 54 °C Primeranlagerungstemperatur durchgeführte TEM/SHV-Dualplex war nicht möglich.

Die Möglichkeit einer Integration dieser bewährten Primer in ein Multiplexformat wurde mit Hilfe einer PCR mit *Step-Down*-Temperaturprofil getestet. Dabei folgten auf Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C Zyklen mit der niedrigeren Annealing-Temperatur von 54 °C. Zunächst wurden nur Primer für die drei CTX-M-Gruppen M1, M2 und M9 den TEM- und SHV-Primern hinzugefügt. Damit handelte es sich um eine Multiplex-PCR mit 5 Primerpaaren (5-plex). Alle Primer wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt (0,4 μ M). Zur Etablierung der *Step-Down*-PCR wurden folgende Zyklen-Kombinationen getestet:

(I) 5 bei 58 °C und 25 bei 54 °C, (II) 10 bei 58 °C und 20 bei 54 °C und (III) jeweils 15 bei 58 °C und 54 °C.

Tabelle 3-1: „original“-Primer zur Amplifikation von CTX-M-β-Lactamasegenen

Zielgen	Primername	Primersequenz (5'-3')	Länge	T _M [°C]
CTX-M- β-Lactamasen				
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -ähnlich	CTX-M1 for _{original}	ATGGTTAAAAAATCACTGCG	20	49.2
	CTX-M1 re _{original}	CCGTTGGTGACGATTTTAGCC	21	56.5
<i>bla</i> _{CTX-M-2} -ähnlich	CTX-M2 for _{original}	ATGATGACTCAGAGCATTCGC	21	55.1
	CTX-M2 re _{original}	CCGTGGGTTACGATTTTCGCC	21	58.9
<i>bla</i> _{CTX-M-8} -ähnlich	CTX-M8 for _{original}	ATGATGAGACATCGCGTTAAGC	22	55.2
	CTX-M8 re _{original}	CCGTCGGTGACGATTTTCGCG	21	61.1
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9 for _{original}	ATGGTGACAAAGAGAGTGC	19	52.5
	CTX-M9 re _{original}	CCCTTCGGCGATGATTCTCGC	21	60.6
<i>bla</i> _{CTX-M-25} -ähnlich	CTX-M25 for _{original}	ATGATGAGAAAAAGCGTAAGG	21	50.7
	CTX-M25 re _{original}	CCGTCGGTGACAATCTCGCG	21	60.9

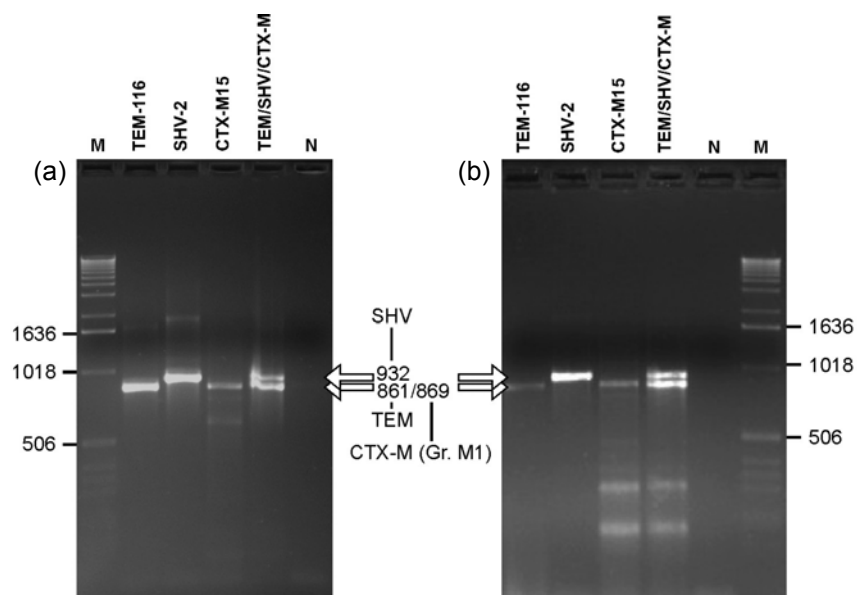


Abbildung 3-2: Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation von *bla*_{TEM}⁻, *bla*_{SHV}⁻ und *bla*_{CTX-M}⁻-Genen mit den CTX-M_{original}-Primerpaaren. (a) Ergebnis der TEM/SHV/CTX-M 5-plex Step-Down-PCR (5 Zyklen bei 58 °C, 30 Zyklen bei 54 °C). M, DNA-Längenstandard; Spuren 2 - 4: einzelne *Templates* unterschiedlicher *bla*-Gene; Spur 5: TEM-116, SHV-2 und CTX-M-15 (klinisches Isolat 14) *Templates*; N, Negativkontrolle. (b) Entsprechendes Ergebnis der TEM/SHV/CTX-M 7-plex-Step-Down-PCR (10 Zyklen bei 58 °C, 20 Zyklen bei 54 °C).

Die 5-plex-Step-Down-PCR wurde für die Amplifikation von *bla*_{TEM-116}, *bla*_{SHV-2} und *bla*_{CTX-M-15} (Gruppe M1) getestet (Abbildung 3-2 a). Bereits bei fünf anfänglichen Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C, lieferte die PCR spezifische Produkte für alle drei *bla*-Gene. Die Ausbeuten für die verschiedenen Amplikons, vor allem für *bla*_{TEM} und *bla*_{CTX-M}, variierten stark mit der verwendeten Zyklen-Kombination. Die Kombination aus 10 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C, gefolgt von 20 mit 54 °C, lieferte diesbezüglich den

besten Kompromiss. Dieses PCR-Protokoll wurde als Markierungs-PCR zur gleichzeitigen Vervielfältigung derselben bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Allele verwendet und lieferte markierte Ziel-DNA mit einer Einbaurrate von 89 NT/Cy3. Das markierte Multiplex-PCR-Produkt konnte erfolgreich für die Hybridisierung eingesetzt werden (Abbildung 3-15).

Das Konzept der *Step-Down*-PCR wurde ebenfalls für die Kombination von TEM- und SHV-Primern mit allen fünf CTX-M-Primerpaaren getestet (Abbildung 3-2 b). Damit handelte es sich um eine Multiplex-PCR mit 7 Primerpaaren (7-plex). Die PCR lieferte spezifische Produkte für alle drei bla -Gene. Die Ausbeuten für bla_{TEM} und bla_{CTX-M} waren deutlich geringer als für bla_{SHV} . Die Zugabe der für die CTX-M-Gruppen M8 und M25 spezifischen Primer führte zusätzlich zu mehreren Nebenprodukten.

Des Weiteren wurde das Temperaturprofil der *Step-Down*-PCR für die Amplifikation eines bla_{CTX-M} -Gens der Gruppe M9 getestet. Zum Screening eines klinischen *Enterobacter*-Isolates wurden die CTX-M-Primerpaare einzeln bzw. in einem Multiplex-Format eingesetzt (Abbildung 3-3). Die CTX-M_{original}-Primer konnten spezifisch ein bla_{CTX-M} -Gen dieser Gruppe amplifizieren, während drei weitere Primerpaare (M2, M8 und M25) eine Reihe unspezifischer Nebenprodukte produzierten. Der Multiplex-Ansatz lieferte ebenfalls das spezifische bla_{CTX-M} -Produkt. Die Ausbeute an spezifischem Produkt war jedoch im Vergleich (I) zur Amplifikation mit den CTX-M_{original}-Primern alleine (siehe Spur 3), (II) zu den Nebenprodukten und (III) zur Vervielfältigung eines bla_{CTX-M} -Gens der Gruppe M1 (siehe Spur P), sehr gering.

Das beschriebene Screening wurde alternativ zur *Step-Down*-PCR auch mit einer Primeranlagerungstemperatur von 58 °C durchgeführt. Die CTX-M-Multiplex-PCR lieferte auch bei der vermeintlich optimalen Annealing-Temperatur sehr niedrige Ausbeuten für bla_{CTX-M} -Gene der Gruppe M9.

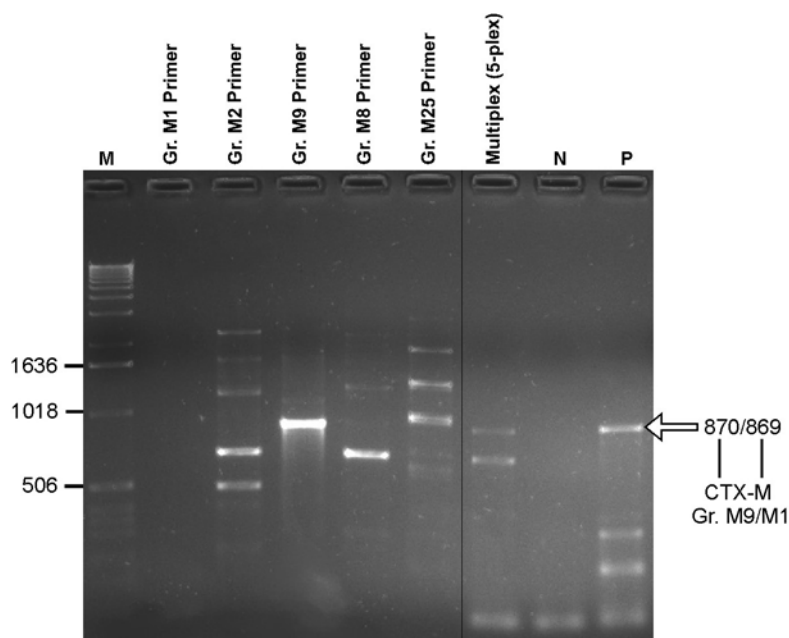


Abbildung 3-3: Multiplex-PCR zur Amplifikation von bla_{CTX-M} Genen. Amplifikation eines $bla_{CTX-M-9}$ -Gens (*Enterobacter*-Isolat) mit einzelnen Gruppen-spezifischen CTX-M_{original}-Primerpaaren (Spuren 2 - 6) im Vergleich zur Amplifikation in einem Multiplexformat mit allen 5 Primerpaaren (Spur 7). *Step-Down*-PCR (10 Zyklen bei 58 °C, 20 Zyklen bei 54 °C); M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle; P, Positivkontrolle mit CTX-M-15 (klinisches Isolat 14) als *Template*.

Fazit: Die Amplifikation von *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} in einem Multiplex-PCR-Format konnte gezeigt und hergestellte markierte Ziel-DNA erfolgreich für die Hybridisierung auf einem integrierten TEM/SHV/CTX-M-Microarray eingesetzt werden. Während die TEM- und SHV-Primer kompatibel waren, musste für die Integration der CTX-M-Primer ein *Step-Down*-PCR-Protokoll entwickelt werden. Die Annealing-Temperaturen in diesem Protokoll waren jedoch weder für die TEM- noch für die CTX-M-Primer optimal. Daher musste ein Kompromiss bezüglich der Ausbeute eingegangen werden. Da speziell *bla*_{CTX-M}-Gene der Gruppe M9 nur wenig sensitiv detektiert wurden, fehlte diesem Protokoll die Robustheit für die Testung einer großen Zahl klinischer Proben, deren Qualität schwanken kann. Zur Verbesserung der Kompatibilität wurde daher ein Redesign der CTX-M-Primer durchgeführt.

3.1.1.2. CTX-M Primer-Redesign

Für das Redesign der CTX-M-Primer wurden folgende Ziele formuliert: Die Primer sollten für eine Annealing-Temperatur von 54 °C optimiert werden. Dadurch sollte die Kompatibilität zur bereits etablierten TEM/SHV-Dualplex-PCR erhöht werden. Außerdem sollten die Primer einzeln und in einem CTX-M-Multiplexformat (5-plex) funktionieren. Dies ermöglicht die spätere Integration in die TEM/SHV-PCR oder zumindest die parallele Amplifikation (bei gleichen PCR-Bedingungen). Darüber hinaus sollten jeweils alle Positionen abgedeckt werden, die mit Hilfe des CTX-M-Microarrays genotypisiert werden.

Besonders der letzte Punkt schränkte das Design stark ein, da nahezu das ganze Gen amplifiziert werden musste und daher nur sehr kurze Sequenzabschnitte für die Platzierung der Vor- und Rückwärtsprimer zur Verfügung standen. Ein hoher GC-Gehalt und mögliche Sekundärstrukturen innerhalb dieser Sequenzabschnitte führten zusätzlich zu einer Verringerung der Variationsmöglichkeiten. Tabelle 3-2 fasst die überarbeiteten CTX-M-Primer zusammen. Änderungen wurden hauptsächlich am 5'-Ende vorgenommen.

Tabelle 3-2: Redesign der Primer zur Amplifikation von CTX-M β-Lactamasegenen

Zielgen	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Länge	T _M [°C]
CTX-M- β-Lactamasen				
<i>bla</i> _{CTX-M-1} -ähnlich	CTX-M1 for _{WRedesign}	ATGGTTAAAAAATCACTGCG	20	49.2
	CTX-M1 rev _{WRedesign}	TGACGATTTTAGCCGCC	17	52.8
<i>bla</i> _{CTX-M-2} -ähnlich	CTX-M2 for _{WRedesign}	ATGACTCAGAGCATTCGC	18	52.4
	CTX-M2 rev _{WRedesign}	TGGGTTACGATTTTCGCC	18	52.9
<i>bla</i> _{CTX-M-8} -ähnlich	CTX-M8 for _{WRedesign}	ATGAGACATCGCGTTAAGC	19	52.8
	CTX-M8 rev _{WRedesign}	GGTGACGATTTTCGCG	16	51.4
<i>bla</i> _{CTX-M-9} -ähnlich	CTX-M9 for _{WRedesign}	ATGGTGACAAAAGAGAGTGC	19	52.5
	CTX-M9 rev _{WRedesign}	TTCGGCGATGATTCCTCGC	18	55.2
<i>bla</i> _{CTX-M-25} -ähnlich	CTX-M25 for _{WRedesign}	ATGATGAGAAAAGCGTAAGG	21	50.7
	CTX-M25 rev _{WRedesign}	CGGTGACAATTCTGGCG	17	54.0

Die Schmelztemperaturen der CTX-M-Primer betragen nun zwischen 49,2 °C und 54 °C. Der T_M-Bereich wurde durch das Redesign von 11,9 °C um 7,7 °C auf 4,8 °C verringert. Die durchschnittliche T_M betrug 52 °C und damit 4 °C weniger als zuvor. Im Zuge des CTX-M-Primer-Redesigns wurden auch die Primer der TEM/SHV-Dualplex-PCR optimiert. Durch die Kürzung der SHV-Primer um 1 (forw) bzw. 2 (rev) Nukleotide am 5'-Ende konnte der Schmelztemperatur-Bereich aller Primer um 4,4 °C auf 5,3 °C verringert und damit die Spezifität der SHV-Primer bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C gesteigert werden.

Die durchschnittliche T_M von 52, °C lag nur 0,1 °C über der durchschnittlichen T_M der CTX-M-Primer. Die TEM- und SHV-Primer sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Die überarbeiteten CTX-M-Primerpaare wurden für die Amplifikation von verschiedenen bla_{CTX-M} -Allelen der Gruppen M1, M2 und M9 getestet. Als Annealing-Temperatur wurden 54 °C gewählt. Wurden die Primerpaare einzeln eingesetzt, lieferten die PCR-Reaktionen spezifische Produkte für z. B. $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-5}$, $bla_{CTX-M-9}$ und $bla_{CTX-M-14}$. Das Multiplex-Format mit Primerpaaren für alle fünf CTX-M-Gruppen (5-plex) lieferte meist kein korrektes Produkt. Abbildung 3-4 a vergleicht die Amplifikation eines $bla_{CTX-M-9}$ -Genes mit dem Primerpaar CTX-M9_{Redesign} und im 5-plex-Format. Die Multiplex-PCR lieferte kein Produkt. Abbildung 3-4 b und c dokumentieren weitere negative Ergebnisse für $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-5}$, $bla_{CTX-M-9}$ und $bla_{CTX-M-14}$. Lediglich $bla_{CTX-M-3}$ konnte vervielfältigt werden.

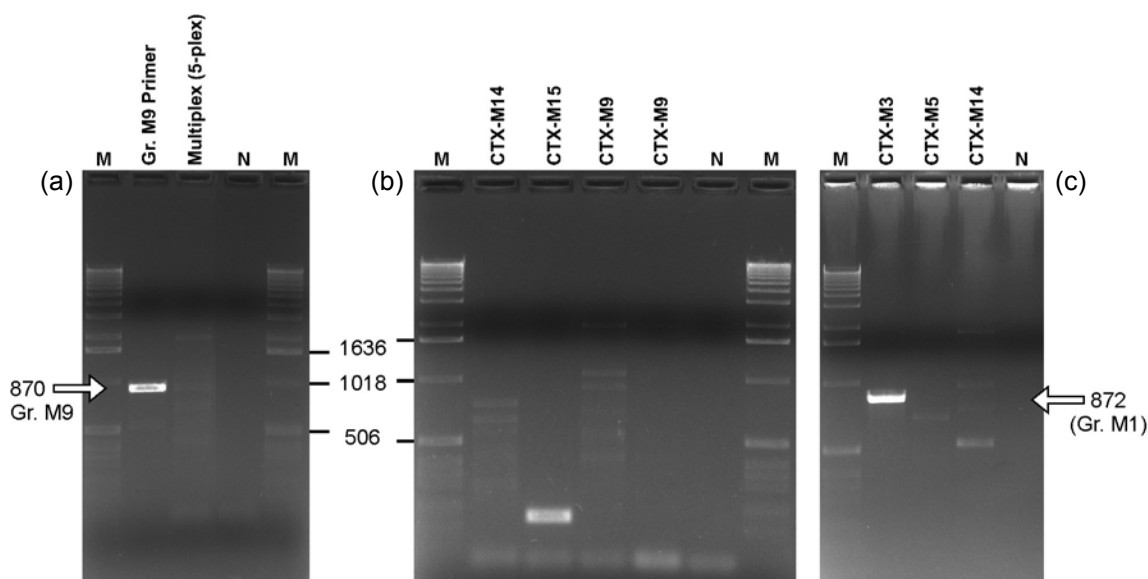


Abbildung 3-4: Multiplex-PCR zur Amplifikation von bla_{CTX-M} -Genen mit den CTX-M_{Redesign}-Primerpaaren. (a) Amplifikation eines $bla_{CTX-M-9}$ -Genes (*Enterobacter*-Isolat) mit dem CTX-M9_{Redesign}-Primerpaar im Vergleich zur Amplifikation im Multiplexformat mit allen 5 Primerpaaren. (b) Multiplex-PCR mit verschiedenen bla_{CTX-M} -Genen als *Template*. CTX-M-14 (klinisches Isolat 43), CTX-M-15 (klinisches Isolat 14) und CTX-M-9 (*Enterobacter*-Isolat). (c) siehe (b); CTX-M-3 (klinisches Isolat 3-1), CTX-M-5 (klinisches Isolat 5-1) und CTX-M-14 (klinisches Isolat 14-1). Annealing-Temperatur: 54 °C; M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle.

Eine ausführliche Analyse der Primersequenzen mit Schwerpunkt auf mögliche Interaktionen zwischen Primern unterschiedlicher CTX-M-Gruppen führte zur Identifikation einer Reihe stabiler Heterodimere. Dimere mit vier und mehr komplementären Nukleotiden im sensitiven 3'-Bereich der Primer konnten z. B. für folgende Primer detektiert werden: CTX-M1 forw + CTX-M9 rev, CTX-M1 forw + CTX-M25 rev, CTX-M2 forw + CTX-M9 forw, CTX-M2 rev + CTX-M25 forw, CTX-M2 rev + CTX-M25 rev. Der Primer CTX-M9 rev war von einem starken Dimer mit sich selbst betroffen. Zur Lösung dieses Problems wurden verschiedene PCR-Kits und Sekundärstruktur-auflösende Agenzien, wie z. B. Q-Solution (Qiagen) oder Betain, getestet. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen vor dem ersten Produktionszyklus der PCR wurde das HotStar *Taq* PCR-Kit von Qiagen getestet. Des Weiteren wurde das Advantage-GC PCR-Kit von Clontech getestet, das für GC reiche *Templates* optimiert ist. Keine dieser Maßnahmen verbesserte die Leistung der CTX-M-Multiplex-PCR entscheidend. Von einem weiteren Redesign wurde aufgrund der nahezu ausgeschöpften Möglichkeiten abgesehen.

Fazit: Die modifizierten CTX-M-Primer konnten einzeln für die Amplifizierung von *bla*_{CTX-M}-Genen verschiedener CTX-M-Gruppen mit einer Annealing-Temperatur von 54 °C eingesetzt werden. Diese Primer stehen daher für eine parallele Amplifikation von *bla*_{CTX-M}-Genen und *bla*_{TEM}/*bla*_{SHV}-Genen mit identischen PCR-Bedingungen zur Verfügung. Eine ausreichend robuste CTX-M-Multiplex-PCR konnte aufgrund von Einschränkungen im Primerdesign und der Ausbildung unvorteilhafter Heterodimere zwischen verschiedenen Primern nicht etabliert werden. Da eine parallele Amplifizierung mit einem höheren Aufwand an Probenmaterial und Reagenzien verbunden ist, wurde für die Validierung des Microarrays eine alternative Amplifikationsstrategie entwickelt.

3.1.1.3. Alternative Amplifikationsstrategie

Für die Validierung des Microarrays mit klinischen Isolaten wurde folgende PCR-Strategie entworfen: (I) Amplifikation und Markierung der potentiell vorhandenen *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV}-Gene mittels TEM/SHV-Dualplex-PCR. (II) Screening der Isolate nach potentiell vorhandenen *bla*_{CTX-M}-Genen mit Hilfe einer CTX-M-Multiplex-PCR und Identifikation der CTX-M-Gruppenzugehörigkeit aufgrund verschiedener Amplikongrößen. (III) Herstellung der markierten *bla*_{CTX-M}-Ziel-DNA für die Hybridisierung mit Gruppen-spezifischen Primern.

Zu (I): Die TEM/SHV-Dualplex-PCR wurde im Laufe dieser Arbeit optimiert. Die Kürzung der SHV-Primer wurde bereits beschrieben. Die Dauer der PCR konnte durch Kürzung der Zeiten für Primeranlagerung und Denaturierung auf jeweils 30 s signifikant verringert werden. Bei der Verwendung eines Thermocyclers mit Silberblock (ep gradient S) betrug die Gesamtdauer 73 min (siehe 2.2.5.1).

Zu (II): Die Etablierung einer CTX-M-Multiplex-PCR für das Screening nach *bla*_{CTX-M}-Genen basierte auf von Woodford und Kollegen beschriebenen Primerpaaren (Woodford et al. 2006b). Die Sequenzen dieser Primer sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Die Primernamen wurden mit dem Zusatz „multi“ versehen. Die fünf Primerpaare führten für die verschiedenen CTX-M-Gruppen zu spezifischen PCR-Produkten zwischen 205 und 552 bp (siehe 2.2.5.1). Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des Qiagen Multiplex PCR Kits etabliert. Von Woodford und Kollegen wurde eine Annealing-Temperatur von 52 °C verwendet. Der Master Mix des Qiagen Multiplex PCR Kits enthält den so genannten „Faktor MP“, der nach Angabe des Herstellers eine effiziente Primeranlagerung und -extension unabhängig von der Primersequenz ermöglicht. Des Weiteren sollen die lokale Primerkonzentration am *Template* erhöht und der spezifisch gebundene Primer stabilisiert werden. Aufgrund dieses Faktors werden Annealing-Temperaturen über 57 °C empfohlen. Folgende Temperaturen wurden für die Amplifikation von *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-5} und *bla*_{CTX-M-9} getestet: 52 °C, 55 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C und 60 °C (Abbildung 3-5). Alle Primer wurden in einer Konzentration von 0,2 µM eingesetzt. Das Temperaturprofil und weitere Details dieser PCR wurden in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben. Bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C und höher lieferte die PCR korrekte PCR-Produkte für die *bla*_{CTX-M}-Gene der verschiedenen Gruppen. Die von Woodford und Kollegen verwendete Temperatur von 52 °C war für die Amplifikation von *bla*_{CTX-M-9} nicht adäquat. Die optimale Annealing-Temperatur betrug 60 °C. Die PCR lieferte bei dieser Temperatur die wenigsten Nebenprodukte und die Ausbeute wurde durch die hohe Annealing-Temperatur ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die Amplifikation von *bla*_{CTX-M-9} lieferte jeweils die schwächsten Banden. Für die CTX-M9 multi Primer wurde daher eine Verdopplung der Primerkonzentration von 0,2 µM auf 0,4 µM getestet (Abbildung 3-6). Die Erhöhung der Primerkonzentration wirkte sich positiv auf die Ausbeute aus. Bei gleicher *Template*-Menge lieferte die PCR nun ähnlich starke Banden für die Vertreter der CTX-M-Gruppen M1, M2 und M9. Für das Screening der klinischen Isolate wurde die PCR mit folgenden Parametern verwendet: T_A = 60 °C; CTX-M9 multi-Primerkonzentration = 0,4 µM.

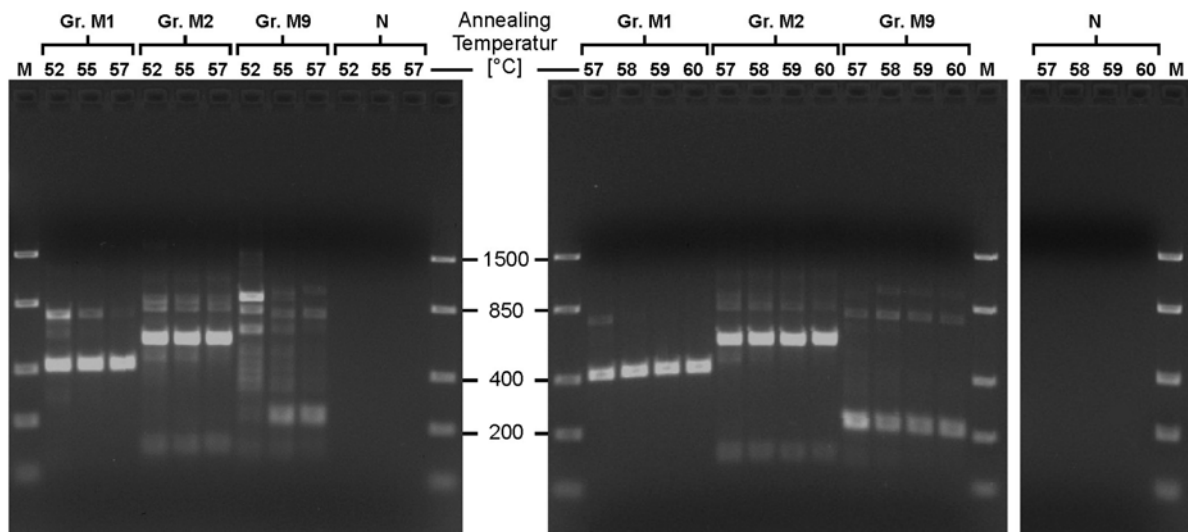


Abbildung 3-5: Etablierung der Multiplex-PCR zur Detektion von *bla*_{CTX-M}-Genen I. Vergleich verschiedener Annealing-Temperaturen (52 – 57 °C bzw. 57 – 60 °C) während der Amplifikation verschiedener *bla*_{CTX-M}-Referenzgene. M, DNA-Längenstandard; *Templates* für Gruppe M1: CTX-M-3 (klinisches Isolat 3-1), Gruppe M2: CTX-M-5 (klinisches Isolat 5-1) und Gruppe M9: CTX-M-14 (klinisches Isolat 14-1); N, Negativkontrolle. Die erwarteten Amplikongrößen für Gruppe M1, M2 bzw. M9 betragen 415, 552 bzw. 205 Basenpaare.

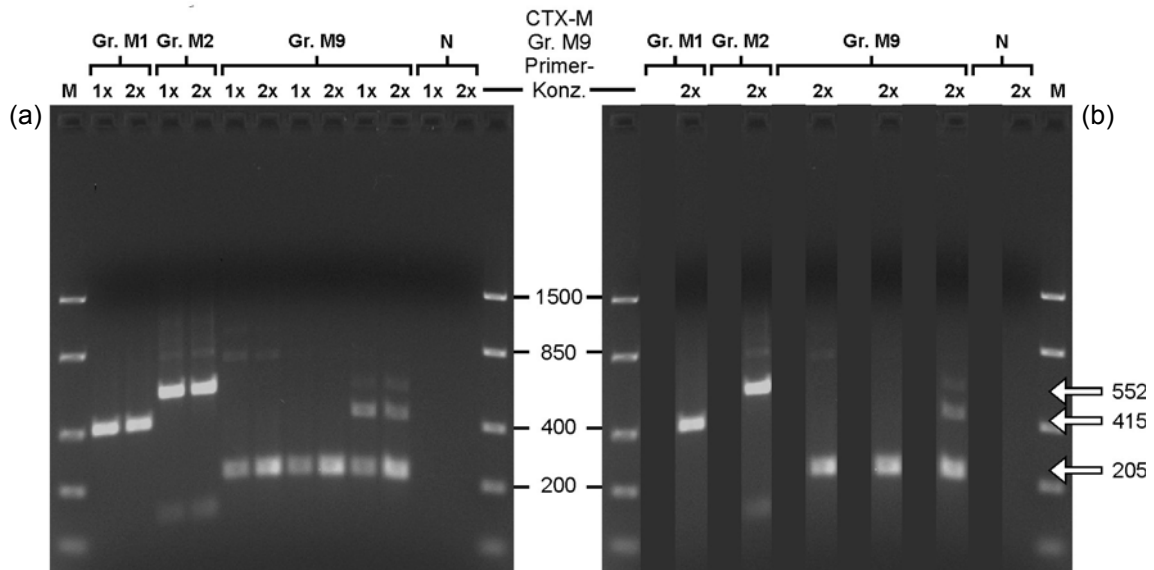


Abbildung 3-6: Etablierung der Multiplex-PCR zur Detektion von *bla*_{CTX-M}-Genen II. (a) Vergleich verschiedener CTX-M Gruppe M9 Primerkonzentrationen während der Amplifikation unterschiedlicher *bla*_{CTX-M}-Referenzgene mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C (1x, alle Primer äquimolar: 0,2 µM; 2x, Gruppe M9-Primer: 0,4µM, alle anderen Primer: 0,2µM). M, DNA-Längenstandard; *Templates* für Gruppe M1: CTX-M-3 (klinisches Isolat 3-1), Gruppe M2: CTX-M-5 (klinisches Isolat 5-1), Gruppe M9: CTX-M-14 (klinisches Isolat 14-1), CTX-M-9 (*Enterobacter*-Isolat) und CTX-M-14 (klinisches Isolat 43); N, Negativkontrolle. (b) Identisches Gel, jedoch mit zur Verdeutlichung ausgeblendeten 1x-Spuren. Die erwarteten Amplikongrößen für Gruppe M1, M2 bzw. M9 betragen 415, 552 bzw. 205 Basenpaare.

Zu (III): Zur Herstellung der markierten bla_{CTX-M} -Ziel-DNA für die Hybridisierung wurden Gruppen-spezifische Primer verwendet. Diese von Eckert und Kollegen veröffentlichten Primer (Eckert et al. 2006) für die CTX-M-Gruppen M1, M2 und M9 sind ebenfalls in Tabelle 2-1 enthalten. Für die Amplifizierung von $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-5}$ und $bla_{CTX-M-9}$ wurden folgende Annealing-Temperaturen getestet: 55 °C, 57 °C, 59 °C und 60 °C (Abbildung 3-7). Das PCR-Protokoll basierte im Wesentlichen auf dem Standard-Protokoll, welches auch für die Amplifizierung von bla_{TEM} und bla_{SHV} eingesetzt wurde (siehe 2.2.5.1). Die Primer arbeiteten bei allen Temperaturen sehr spezifisch und identisch effizient. Für die Herstellung der markierten bla_{CTX-M} -Ziel-DNA wurde eine Annealing-Temperatur von 60 °C verwendet, da die PCR bei dieser Temperatur die spezifischsten Ergebnisse lieferte (die wenigsten Nebenprodukte bei der Amplifikation des $bla_{CTX-M-9}$ -ähnlichen Gens) und die Ausbeute nicht beeinträchtigt wurde.

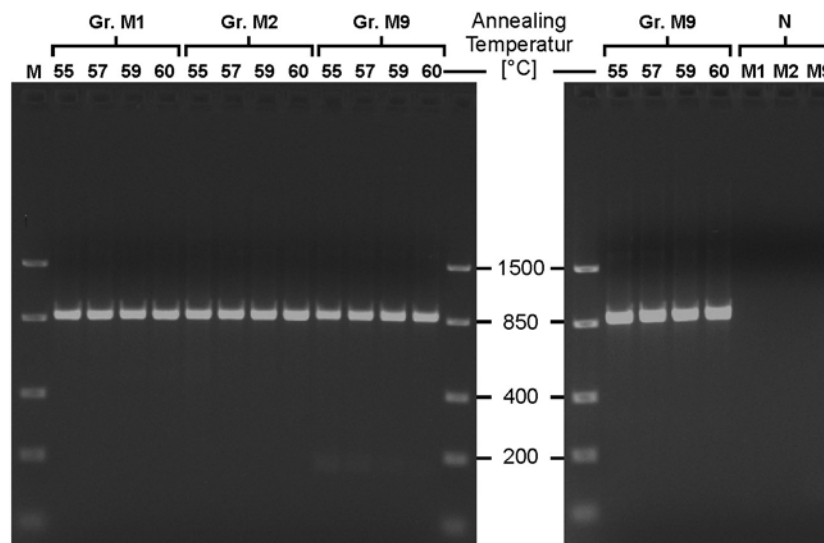


Abbildung 3-7: Vergleich verschiedener Annealing-Temperaturen (55 – 60 °C) während der Amplifikation verschiedener bla_{CTX-M} -Referenzgene mit den Primer-Paaren CTX-M1, CTX-M2 und CTX-M9 (siehe Tabelle 2-1). M, DNA-Längenstandard; *Templates* für Gruppe M1, CTX-M-3 (klinisches Isolat 3-1); Gruppe M2, CTX-M-5 (klinisches Isolat 5-1); Gruppe M9, CTX-M-14 (klinisches Isolat 14-1) und CTX-M-9 (*Enterobacter*-Isolat); N, Negativkontrolle. Die erwarteten Amplikongrößen für Gruppe M1, Gruppe M2 bzw. Gruppe M9 betragen 864, 866 bzw. 870 Basenpaare.

Fazit: Die Entwicklung eines sensitiven und robusten Multiplexformats für die gleichzeitige Amplifikation von bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M} konnte aufgrund der schwierigen Amplifikation der bla_{CTX-M} -Gene nicht erfolgreich durchgeführt werden. Für die Validierung des ESBL-Microarrays mit klinischen Isolaten wurde daher eine Amplifikationsstrategie entwickelt, die eine gemeinsame Vervielfältigung und Markierung von bla_{TEM} und bla_{SHV} in einer TEM/SHV-Dualplex-PCR vorsieht, die Detektion und Amplifikation von vorhandenen bla_{CTX-M} -Genen für die Hybridisierung jedoch trennt. Für diese Aufgaben konnten spezifische, sensitive und robuste PCR-Reaktionen etabliert werden. Aufgrund der Zuordnung eines detektierten bla_{CTX-M} -Gens zu einer CTX-M-Gruppe und der anschließenden Gruppen-spezifischen Herstellung der Ziel-DNA wurde der Aufwand an Probenmaterial und PCR-Reagenzien minimiert. Die CTX-M-PCR-Reaktionen konnten nicht mit Vertretern der Gruppen M8 und M25 getestet werden, da für diese bla_{CTX-M} -Gene kein Referenzmaterial vorlag. ESBL- bzw. CTX-M-negative Isolate wurden deshalb zusätzlich mit Hilfe weiterer PCR-Methoden überprüft (z. B. CTX-M_{original}-Primer).

3.1.2 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Die Sonden der verschiedenen Chipmodule zur Genotypisierung von bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M} wurden für einheitliche Hybridisierungsbedingungen entworfen. Die TEM-Sonden eines ersten TEM-Prototyps zeigten gute Leistungen bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C und 6x SSPE-Puffer als Hybridisierungslösung (Grimm 2005). Die Sonden des SHV- und CTX-M-Chipmoduls wurden anschließend für diese Bedingungen entwickelt. Die Sonden des TEM-Prototyps besaßen jedoch im Gegensatz zu den SHV- und CTX-M-Sonden noch keine Aminomodifikation, und als Trägermaterial für die verschiedenen Microarrays wurden *Slides* der Firma Elipsa verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sequenzen der TEM-Sonden mit Aminomodifikationen versehen. Zusätzlich musste auf ein alternatives Substrat (Nexterion Slide E) gewechselt werden. Diese für die Integration nötigen Schritte werden ausführlich in Kapitel 3.1.3.2 besprochen. Die Veränderungen hatten größere Auswirkungen auf das etablierte System als erwartet. Zahlreiche Testhybridisierungen mit verschiedenen Integrationsstufen des ESBL-Microarrays (z. B. TEM- oder SHV-Chipmodul einzeln, Dreifach-Chip) zeigten einen generellen Anstieg der Signalintensitäten der Mismatch-Sonden im Vergleich zu den jeweiligen Perfect Match-Sonden. Die Hybridisierungsbedingungen wurden als nicht ausreichend stringent bewertet. Zusätzlich traten nach Wechsel des Trägermaterials, selbst bei automatisierter Hybridisierung, häufiger Salzrückstände und andere Artefakte im Hintergrund auf.

Aufgrund dieser veränderten Ausgangssituation wurde eine Optimierung der Hybridisierungsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden folgende Ziele verfolgt: (I) Ermittlung optimaler Bedingungen für eine spezifischere Hybridisierung. (II) Vermeidung einer Reduktion der absoluten Signalintensitäten, welche die Sensitivität des Assays verringern würde. (III) Eliminierung von Hybridisierungsartefakten für eine robustere Hybridisierung. Die Integration verschiedener SONDENSÄTZE für die gleichzeitige Genotypisierung verschiedener *Targets* erhöht zusätzlich den Anspruch an eine sehr spezifische Hybridisierung. Durch eine zu niedrige Stringenz während der Hybridisierung verschlechtern sich nicht nur die Leistungen einzelner SONDENSÄTZE, negative Kreuzreaktivitäten werden ebenfalls wahrscheinlicher. Die Optimierung wurde für das TEM-Chipmodul durchgeführt, da die thermodynamischen Daten der TEM-Sonden den Ausgangspunkt für jedes weitere SONDENSÄTZE lieferten. Die ermittelten Hybridisierungsbedingungen sollten später für den integrierten Microarray übernommen, das Verhalten der SHV- und CTX-M-SONDENSÄTZE mit Hilfe von Testhybridisierungen analysiert und einzelne SONDENSÄTZE gegebenenfalls überarbeitet werden.

Für die Auswertung der Versuchsreihen wurden folgende Werte berechnet: (I) Die mittleren Signalintensitäten aller Perfect Match- (mI_{PM}) und Mismatch-Sonden (mI_{MM}) (siehe 2.2.9). Der Vergleich dieses Wertes beschreibt den Einfluss einer Veränderung der Hybridisierungsparameter auf die absoluten Signalintensitäten. Dieser Einfluss wurde quantifiziert, indem die Differenz zweier mI -Werte gebildet wurde (ΔmI). (II) Das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden (mRI). Dieser Wert beschreibt die durchschnittliche Signalintensität einer Mismatch-Sonde im Vergleich zu ihrer Perfect Match-Sonde unter bestimmten Hybridisierungsbedingungen, und wurde als Maß für die Spezifität der Hybridisierung bzw. das Diskriminierungsvermögen der SONDENSÄTZE verwendet. Die Veränderung dieses Wertes wurde ebenfalls durch die Differenz zweier mRI -Werte ausgedrückt (ΔmRI).

3.1.2.1. Hybridisierungslösung und Hybridisierungstemperatur

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss der Zusammensetzung der Hybridisierungslösung und der Hybridisierungstemperatur auf die Signalintensitäten und das Diskriminierungsvermögen der Sonden des TEM-Chipmoduls untersucht. Bei der Zusammensetzung der Hybridisierungslösung wurde die SSPE-Pufferkonzentration und SDS-Konzentration variiert. Zur Hybridisierung wurde standardmäßig eine 6x SSPE-Lösung

verwendet. Alternativ wurde eine SDS-haltige 2x SSPE-Lösung getestet. Die SDS-Konzentration betrug 0,001 %. Parallel wurden folgende Hybridisierungstemperaturen verwendet: 45 °C, 47 °C, 49 °C und 51 °C. Durch die Verringerung der Salzkonzentration und Erhöhung der Temperatur wurden also deutlich stringenter Hybridisierungsbedingungen getestet.

Für alle Testhybridisierungen wurde die gleiche *bla*_{TEM-8}-Ziel-DNA mit einer Einbaurate von 43 NT/Cy-3 eingesetzt. Als Testchip-Layout wurde das in Kapitel 6.3 beschriebene 2 x 2 Subarray-Layout verwendet. Für die Herstellung der Testchips wurden TEM-Sonden mit Aminomodifikation auf Epoxy-beschichtete Objektträger (Nexterion Slide E) gedruckt. Hybridisierungen wurden aus zwei Gründen zunächst manuell mit Hilfe von *Gene Frames* und einem Thermomixer durchgeführt (siehe 2.2.7). Erstens aus Kostengründen, da das kompakte 2 x 2 TEM-Layout mehrfach auf einen Objektträger gedruckt und die Microarrays mit Hilfe der *Gene Frames* getrennt verwendet werden konnten. So konnte der Materialaufwand für die Versuchsreihe mehr als halbiert werden. Zweitens wurde der TEM-Chip so gleichzeitig für die Verwendung mit einem, im Vergleich zu einer Hybridisierungsstation kostengünstigeren Gerät optimiert. Die Hybridisierungsdauer betrug eine Stunde. Zur Quantifizierung der Signale wurden alle hybridisierten Chips mit drei verschiedenen PMT-Einstellungen gescannt (50, 55 und 60 %).

Abbildung 3-8 zeigt den Einfluss der Hybridisierungstemperatur und der Zusammensetzung der Hybridisierungslösung auf die absoluten Signalintensitäten (mI-Werte), Abbildung 3-9 auf das Diskriminierungsvermögen der SONDENSÄTZE (mRI-Werte). Zur Evaluierung des Einflusses verschiedener PMT-Einstellungen wurden die Hybridisierungen mit SDS-haltiger 2x SSPE-Hybridisierungslösung ausgewertet (jeweils a). Die Vergleiche bezüglich der Hybridisierungslösung basierten auf Daten von PMT55-Scanbildern (jeweils b). Die verschiedenen Veränderungen der Hybridisierungsbedingungen wirkten sich wie folgt aus:

(I) Die SDS-haltige Hybridisierungslösung mit verringertem Salzgehalt (2x SSPE) führte bei allen Temperaturen zu einer Abnahme der absoluten Signalintensitäten der Perfect Match- (mI_{PM}) und der Mismatch-Sonden (mI_{MM}). Die Abnahme der Signalintensitäten der Mismatch-Sonden war immer größer als die der Perfect Match-Sonden. Dies führte zu einer Erhöhung der Spezifität. Bei 45 °C verbesserte sich das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden um 10,6 % von 0,246 auf 0,220. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 47 °C war dieser Effekt am stärksten. Der mRI-Wert verbesserte sich um 18,1 % von 0,215 auf 0,176. Die absoluten Signalintensitäten der Perfect Match-Sonden verringerten sich dabei um 8,5 % ($\Delta mI_{PM} = -2489$). Die Angaben basieren auf Auswertungen von PMT55-Scanbildern.

(II) Bei der SDS-haltigen Hybridisierungslösung mit verringertem Salzgehalt (2x SSPE) führte eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von 45 °C auf 47 °C zu einer Zunahme der mittleren Signalintensitäten aller Perfect Match-Sonden um 9,4 % ($\Delta mI_{PM} = +2308$) und zu einer Abnahme der mittleren Signalintensitäten aller Mismatch-Sonden um 6,5 % ($\Delta mI_{MM} = -367$). Damit verbesserte sich das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden um 20 % von 0,220 auf 0,176. Eine weitere Erhöhung der Temperatur hatte zwar einen positiven Effekt auf die Spezifität der Hybridisierung, führte aber zu einer starken Abnahme der absoluten Signalintensitäten. Die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von 45 °C auf 49 °C verringerte die mittleren Signalintensitäten um 27,5 % ($\Delta mI_{PM} = -6808$). Die Angaben basieren auf Auswertungen von PMT55-Scanbildern.

(III) Der Einsatz der SDS-haltigen Hybridisierungslösung mit verringertem Salzgehalt (2x SSPE) bei gleichzeitiger Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von 45 °C auf 47 °C führte daher zu einer vernachlässigbaren Abnahme der absoluten Signalintensitäten der Perfect Match-Sonden (0,9 %, $\Delta mI_{PM} = -235$). Das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden verbessert sich jedoch um 28,5 % von 0,246 auf 0,176 (Pfeil in Abbildung 3-9 b).

(IV) Die verschiedenen PMT-Einstellungen hatten natürlich einen direkten Einfluss auf die absoluten Signalintensitäten. Es konnte auch ein Einfluss auf die mRI-Werte beobachtet werden. Niedrige PMT-Werten führten zu niedrigeren mittleren relativen Signalen aller Mismatch-Sonden als höhere PMT-Werte. Dieser Effekt war bei niedrigen Hybridisierungstemperaturen (45 °C und 47 °C) stärker ausgeprägt als bei höheren (49 °C und 51 °C).

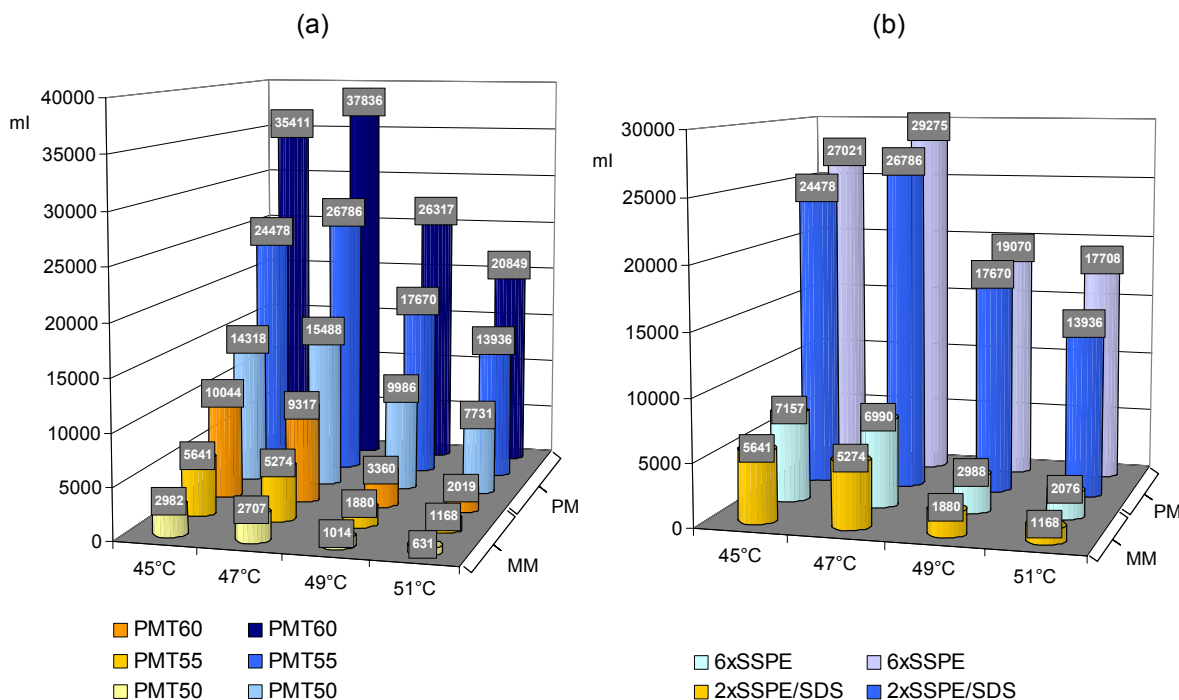


Abbildung 3-8: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die absoluten Signalintensitäten. Vergleich der mittleren Signalintensitäten (ml) aller Perfect Match- und Mismatch-Sonden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und (a) verschiedenen PMT-Einstellungen zur Quantifizierung der Signale (2x SSPE/SDS) bzw. (b) unterschiedlicher Zusammensetzung der Hybridisierungslösung (Pufferkonzentration/SDS, PMT: 55 %).

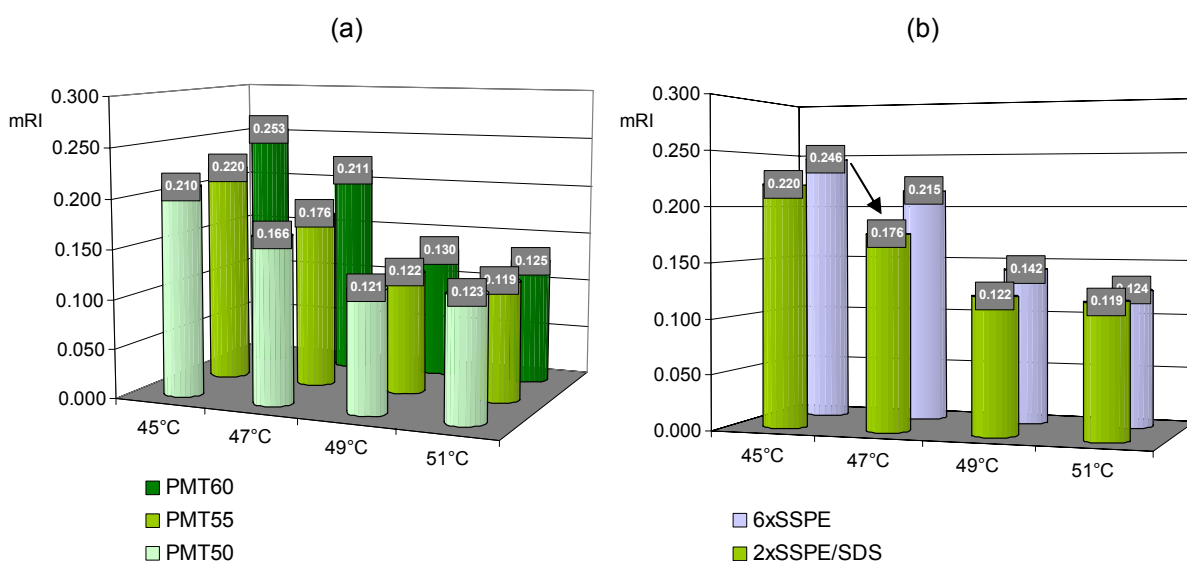


Abbildung 3-9: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Leistungsfähigkeit der SONDENSÄTZE. Vergleich der mittleren relativen Signale (mRI) aller Mismatch-Sonden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und (a) verschiedenen PMT-Einstellungen zur Quantifizierung der Signale bzw. (b) unterschiedlicher Zusammensetzung der Hybridisierungslösung (Pufferkonzentration/SDS).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde überprüft, inwiefern sich die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe auf die automatisierte Hybridisierung (Hybridisierungsstation) übertragen lassen. Hierfür wurden zwar die gleichen Testchips verwendet, allerdings konnten für die automatisierte Hybridisierung nur *Slides* mit jeweils einem Microarray verwendet werden. Die Hybridisierungsdauer betrug eine Stunde, und die hybridisierten Microarrays wurden ebenfalls mit verschiedenen PMT-Einstellungen gescannt. Aufgrund des positiven Effekts einer verringerten Salzkonzentration auf die Hybridisierungseigenschaften der TEM-Sonden, wurden alle Hybridisierungen mit SDS-haltiger 2x SSPE-Hybridisierungslösung durchgeführt. Ein niedriger Salzgehalt verringert zusätzlich die Wahrscheinlichkeit von Salzurückständen. Der Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Signalintensitäten und das Diskriminierungsvermögen der Sonden wurde mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten bei 45 °C und 47 °C überprüft. Für die Testhybridisierungen wurden die beschriebene bla_{TEM-8} -Ziel-DNA und bla_{TEM-3} -Ziel-DNA mit einer Einbaurrate von 72 NT/Cy-3 eingesetzt. Abbildung 3-10 zeigt den Einfluss der Hybridisierungstemperatur (a) auf die absoluten Signalintensitäten (ml-Werte) und (b) das Diskriminierungsvermögen der Sondensätze (mRI-Werte). Folgende Auswirkungen wurden beobachtet:

(I) Die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur führte bei Hybridisierungen mit bla_{TEM-8} -Ziel-DNA zu einer Zunahme der mittleren Signalintensitäten aller Perfect Match-Sonden um 19,9 % ($\Delta ml_{PM} = 3563$) und zu einer Abnahme der mittleren Signalintensitäten aller Mismatch-Sonden um 10,5 % ($\Delta ml_{MM} = -428$). Das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden verbesserte sich um 19,6 % von 0,238 auf 0,192. Die Angaben basieren auf Auswertungen von PMT55-Scanbildern.

(II) Die Hybridisierung mit schwächer markierter bla_{TEM-3} -Ziel-DNA bei 47 °C führte zu deutlich niedrigeren absoluten Signalintensitäten. Das mittlere relative Signal aller Mismatch-Sonden betrug 0,181. Die Angaben basieren auf Auswertungen von PMT55-Scanbildern.

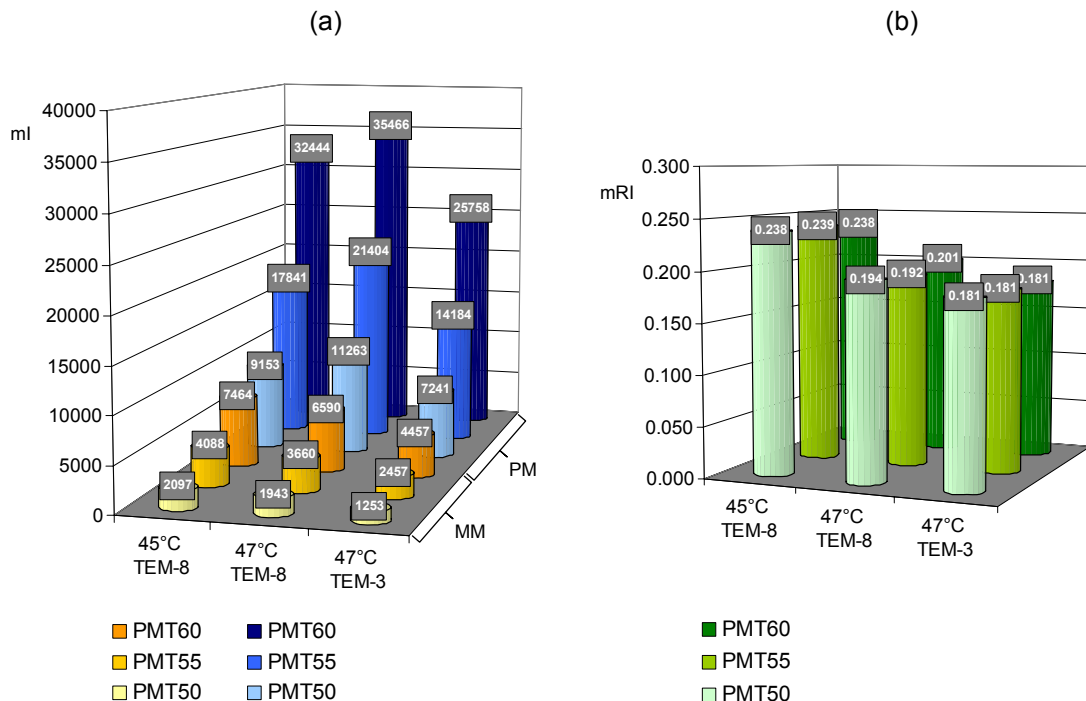


Abbildung 3-10: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die (a) absoluten Signalintensitäten und (b) auf die Leistungsfähigkeit der Sondensätze. (a) Vergleich der mittleren Signalintensitäten (ml) aller Perfect Match-Sonden und Mismatch-Sonden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und verschiedenen PMT-Einstellungen zur Quantifizierung der Signale. (b) Vergleich der mittleren relativen Signale (mRI) aller Mismatch-Sonden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und verschiedenen PMT-Einstellungen zur Quantifizierung der Signale.

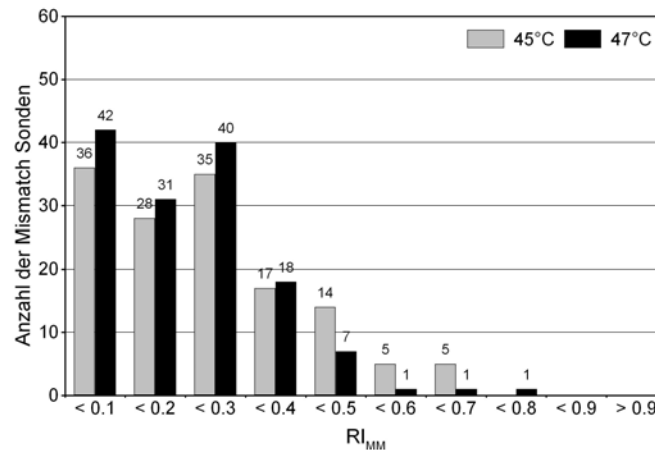


Abbildung 3-11: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Verteilung der relativen Intensitäten aller Mismatch-Sonden (RI_{MM} -Werte) über definierte RI_{MM} -Bereiche. Die Gesamtmenge der Mismatch-Sonden beträgt 123.

Die mittleren Signalintensitäten (mi) und relativen Signalintensitäten (mRI) sind globale Werte, die keine detaillierte Bewertung der Leistungsfähigkeit einzelner SONDENSÄTZE zulassen. Daher wurde der Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Verteilung der relativen Intensitäten aller Mismatch-Sonden (RI_{MM} -Werte) über definierte RI_{MM} -Bereiche für die Hybridisierungen mit bla_{TEM-8} -Ziel-DNA betrachtet (Abbildung 3-11). Durch die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur wurde die Anzahl an Mismatch-Sonden, die Signalintensitäten von mehr als 50 % ihrer jeweiligen Perfect Match-Sonde zeigten ($RI_{MM} > 0,5$), um 70 % verringert. Die Anzahl an Mismatch-Sonden mit RI_{MM} -Werten $> 0,4$ wurde um 58 % verringert.

3.1.2.2. Einfluss von SDS auf die Hybridisierung

In den Versuchsreihen zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen wurde SDS als Zusatz zur Hybridisierungslösung mit verringerter Salzkonzentration verwendet. Es wurde jedoch eine sehr geringe Konzentration eingesetzt (0,001 %). In einer weiteren Versuchsreihe wurde isoliert der Effekt von SDS auf die Hybridisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Testhybridisierungen unter optimierten Bedingungen (47 °C, 2x SSPE) durchgeführt und der Hybridisierungslösung SDS in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Folgende SDS-Konzentrationen wurden getestet: 0 %, 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 % und 7 %. Als Testchips wurden wie zuvor TEM-Microarrays verwendet. Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe einer Hybridisierungsstation für eine Stunde. Für alle Testhybridisierungen wurde $bla_{TEM-116}$ -Ziel-DNA mit einer Einbaurrate von 53 NT/Cy-3 eingesetzt. Abbildung 3-12 zeigt den Einfluss von ansteigenden SDS-Konzentrationen (0 - 0,01 %) auf die Qualität der Hybridisierung. Abbildung 3-13 vergleicht die mittleren relativen Signale aller Mismatch-Sonden bei Verwendung verschiedener SDS-Konzentrationen und damit den Einfluss von SDS auf die Spezifität der Hybridisierung. Folgende Effekte wurden beobachtet:

(I) Ohne SDS bzw. beim Einsatz sehr niedriger SDS-Konzentrationen (0,001 %) wurden vermehrt Salzurückstände im Hintergrund und ringartige Artefakte um die Spots beobachtet (Abbildung 3-12 Pfeil 1). Diese Ringe stellen ein Problem für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten dar. Je nach verwendetem Algorithmus für das Finden der Spots beim Auslesen eines Scanbildes, werden diese entweder zum Spot oder zum Hintergrund hinzugezählt. In beiden Fällen kommt es zu einer Verfälschung der Daten, da hintergrundkorrigierte Signalintensitäten den Ausgangspunkt der Auswertung bilden (siehe 2.2.9). Auf eine quantitative Auswertung dieser Experimente wurde daher verzichtet.

Ergebnisse

Bei SDS-Konzentrationen von 0,01 % und größer wurden weder Rückstände im Hintergrund noch andere Artefakte detektiert.

(II) Der Einsatz von SDS wirkte sich negativ auf die Spezifität der Hybridisierung aus. Mit steigender SDS-Konzentration zeigten die Mismatch-Sonden durchschnittlich höhere relative Signale. Trotz dieses Trends wurde auch beim Einsatz von 7 % SDS noch ein ausgezeichneter mRI-Wert von 0,186 ermittelt (PMT: 55 %).

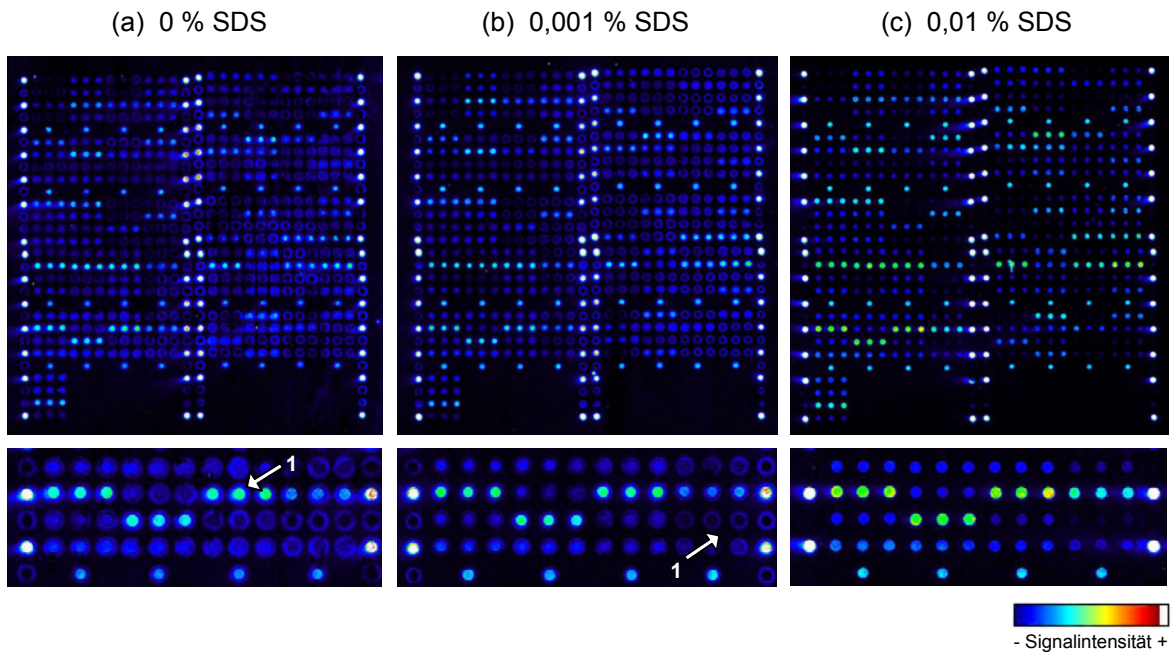


Abbildung 3-12: Einfluss der SDS-Konzentration auf die Hybridisierung. Fluoreszenzbilder des TEM-Chips nach Hybridisierung mit jeweils 100 ng TEM-116 Ziel-DNA (Einbaureate: 53 NT/Cy3) bei Verwendung von (a) 0 %, (b) 0,001 % und (c) 0,01 % SDS. Sonstige Hybridisierungsbedingungen: Automatische Hybridisierung (Tecan HS 400), 1 h, 47 °C, 2x SSPE; PE-Scanner-PMT: 60 %. (1) Ringartige Artefakte.

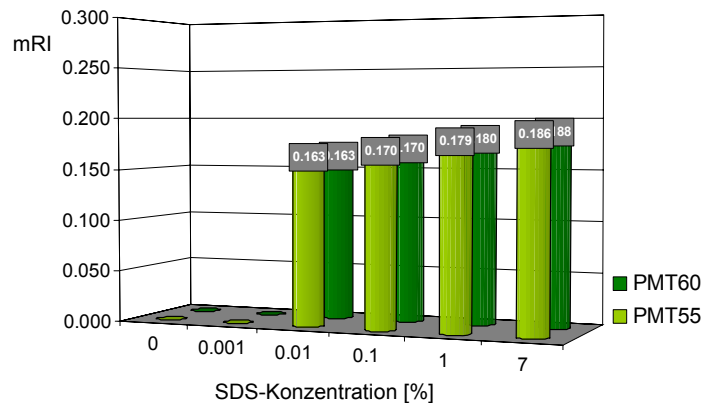


Abbildung 3-13: Einfluss der SDS-Konzentrationen auf die Leistungsfähigkeit der SONDENSÄTZE. Vergleich der mittleren relativen Signale (mRI) aller Mismatch-Sonden bei Verwendung verschiedener SDS-Konzentrationen während der Hybridisierung.

Die ringartigen Artefakte bei niedrigen SDS-Konzentrationen (0 % und 0,001 %) wurden in den Versuchsreihen zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen nicht beobachtet (siehe 3.1.2.1). Die in diesen Experimenten verwendeten *Slides* stammten aus einer anderen Herstellungscharge. Die Oberflächeneigenschaften von *Slides* aus verschiedenen Chargen können variieren (Angabe des Herstellers). Tatsächlich handelte es sich bei den in diesen

Versuchen eingesetzten *Slides* um Objektträger mit kleinerem Kontaktwinkel, also einer hydrophileren Oberfläche. Die im Vergleich hydrophobere Oberfläche, der in der SDS-Versuchsreihe verwendeten *Slides*, erforderte daher eine größere Menge SDS für eine gute Benetzung der Oberfläche mit Hybridisierungslösung (mindestens 0,01 %). Zur Sicherheit wurden ab diesem Zeitpunkt bei Nachbestellungen, nach Rücksprache mit dem Hersteller bezüglich der Kontaktwinkel der verfügbaren Herstellungschargen, die hydrophilsten Slides geordert. Für alle weiteren Hybridisierungen mit einer Hybridisierungsstation wurde eine SDS-Konzentration von 0,1 % eingesetzt. Für die größere Robustheit des Systems im Vergleich zu 0,01 % wurde dabei eine Verringerung der Spezifität um ca. 4 % akzeptiert. Für die manuelle Hybridisierung mit Gene Frames wurde nur 0,01 % SDS eingesetzt. Die starke Verringerung der Oberflächenspannung der Hybridisierungslösung durch SDS erlaubt keine größeren Konzentrationen bei der manuellen Hybridisierung.

Fazit: Insgesamt wurden die Hybridisierungsbedingungen von 45 °C, 6x SSPE, kein SDS zu 47 °C, 2x SSPE, 0,1 % SDS geändert. Durch die Verwendung einer Hybridisierungslösung mit verringertem Salzgehalt (2x SSPE) und einer Hybridisierungstemperatur von 47 °C konnte für den TEM-Microarray die Spezifität der Hybridisierung um mehr als 28 % verbessert werden. Die absoluten Signalintensitäten wurden durch die Änderungen vernachlässigbar verringert (< 1 %). SDS hatte einen positiven Effekt auf die Qualität der Hybridisierung. Die deutlich geringeren Hintergrundintensitäten und die Verhinderung der ringartigen Artefakte führten zu einem besseren Signal-Hintergrund-Verhältnis und damit zu einer sensitiveren und robusteren Detektion. Ausreichend SDS führte zusätzlich zu Robustheit gegenüber schwankenden Oberflächeneigenschaften der Objektträger. Für optimale Hybridisierungsbedingungen musste daher ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden antagonistischen Effekten gefunden werden. Für alle weiteren automatisierten Hybridisierungen wurde eine SDS-Konzentrationen von 0,1 % gewählt, für manuelle Hybridisierungen 0,01 % SDS. Diese optimierten Hybridisierungsbedingungen wurden für den integrierten Microarray übernommen. Das Verhalten der SHV- und CTX-M-Sondensätze unter diesen Bedingungen wurde mit Hilfe von Testhybridisierungen mit dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen umgestalteten Dreifach-Chip analysiert. Diese Hybridisierungen mit TEM-116-, SHV-1- und CTX-M-1-Ziel-DNA bildeten die Basis für das Redesign einiger Sondensätze (siehe 3.1.4.2).

3.1.3 Integration der TEM- SHV- und CTX-M Chipmodule

Die Integration der zuvor entwickelten TEM-, SHV- und CTX-M-Microarrayprototypen zu einem Dreifach-Chip zur gleichzeitigen Genotypisierung dieser drei β -Lactamasegene erfolge in zwei Hauptstufen. Zunächst wurde die Möglichkeit einer Integration überprüft, indem die Sonden der verschiedenen Microarrays getrennt auf denselben Träger gedruckt und zusammen im selben Reaktionsraum hybridisiert wurden. Für die zweite Stufe wurde zusätzlich der Microarray-Herstellungsprozess integriert. Neben unkritischen Änderungen, wie z. B. die Verwendung eines optimierten Array-Layouts, beinhaltete dieser Prozess auch grundlegende Änderungen des Systems, unter anderem die Verwendung Epoxy-beschichteter Objektträger eines anderen Herstellers. Für Hybridisierungen wurde markierte Ziel-DNA aus verschiedenen Evolutionsstufen der PCR-Etablierung verwendet. Die unterschiedlichen Amplifikationsstrategien wurden ausführlich in Kapitel 3.1.1 besprochen.

3.1.3.1. Machbarkeitsnachweis

Die erste Integrationsstufe wurde mit *Epoxy coated glass slides* (3D) der Firma Elipsa realisiert. Zur Integration der TEM- und SHV-Microarrays wurden die einzelnen Arrays nacheinander auf *Slides* dieses Typs gedruckt. Die Sonden des TEM-Prototyps besaßen im Gegensatz zu den SHV-Sonden keine Aminomodifikation. Für die endständige Immobilisierung aminomodifizierter Sonden auf Epoxy-beschichteten *Slides* wird eine Inkubation bei 60 °C empfohlen. Zur Immobilisierung von Sonden ohne Aminomodifikation

wird eine Temperatur von 120 °C verwendet. Zur Klärung, welche der Temperaturen zur Immobilisierung beider Sondenvarianten verwendet werden kann, wurden bedruckte *Slides* parallel bei 60 °C und 120 °C inkubiert und im Anschluss an die obligatorische Wasch- und Blockierungsprozedur mit derselben markierten Ziel-DNA hybridisiert. Für die Testhybridisierungen wurde eine Mischung aus $bla_{TEM-116^-}$ und bla_{SHV-2^-} -Ziel-DNA verwendet, welche in einer TEM/SHV-Dualplex-PCR hergestellt wurde (Abbildung 3-14 a). Alle Hybridisierungen während der Integration erfolgten mit Hilfe einer Hybridisierungsstation. Diese versprach in Anbetracht der großen Fläche des integrierten Microarrays eine gleichmäßigere Durchmischung der Hybridisierungslösung und eine größere Reproduzierbarkeit. Die verschiedenen Microarrayprototypen wurden für einheitliche Hybridisierungsbedingungen entworfen. Sie wurden zuvor ausführlich bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C und mit 6x SSPE-Puffer als Hybridisierungslösung getestet und zeigten gute Leistungen. Für alle Hybridisierungen während der Integration wurden diese Hybridisierungsbedingungen verwendet.

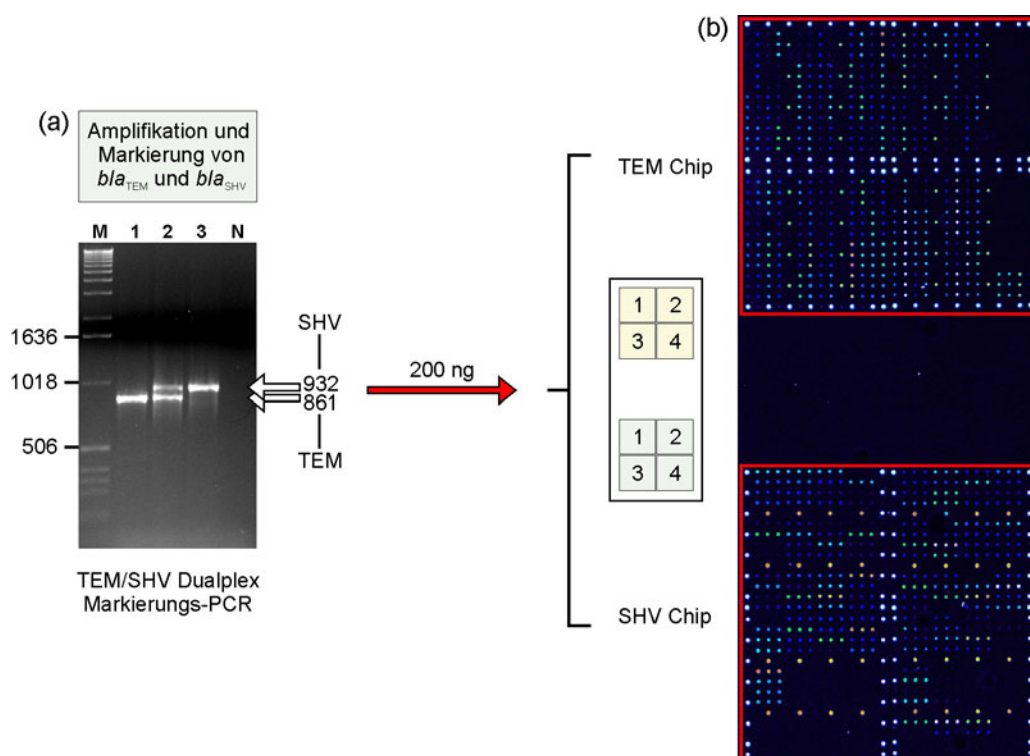


Abbildung 3-14: Integration zweier Chipmodule. (a) Ergebnis der TEM/SHV Dualplex Markierungs-PCR. M, DNA-Längenstandard; Spuren 1 - 3, jeweils 50 ng Plasmid-DNA (Referenzmaterial) als *Template*; Spur 1, TEM 116; Spur 2, TEM 116 und SHV-2; Spur 3, SHV-2; N, Negativkontrolle. (b) Fluoreszenzbild des Zweifach-Chips nach Hybridisierung mit 200 ng des Multiplex PCR-Produkts (Spur 2, Einbaurate: 88 NT/Cy3) und schematische Darstellung der Subarray-Anordnung der Chipmodule. PE-Scanner-PMT: 70 %.

Es konnte kein Einfluss der Immobilisierungstemperatur auf das Ergebnis der Hybridisierung beobachtet werden. Die Inkubation bei 60 °C führte zu einer kovalenten Bindung von Sonden ohne Aminomodifikation und konnte daher zur Immobilisierung beider Sondenvarianten verwendet werden. Abbildung 3-14 b zeigt ein Fluoreszenzbild des TEM/SHV-Zweifach-Chips nach Hybridisierung mit 200 ng Ziel-DNA. Das verwendete *Slide* wurde bei 60 °C immobilisiert. Der integrierte Microarray wurde mit einer PMT-Verstärkung von 70 % gescannt. Beide Chipmodule zeigten ähnliche durchschnittliche absolute Signalintensitäten der Perfekt Match-Sonden (I_{PM}). Der I_{PM} -Wert der TEM-Sonden betrug ca. 12000

Intensitätseinheiten, der I_{PM} -Wert der SHV-Sonden ca. 16000. Theoretisch könnten die verschiedenen Chipmodule oder sogar einzelne SONDENSÄTZE nach dem Scannen mit der jeweils optimalen PMT-Einstellung ausgewertet werden. Um den Ablauf des Assays jedoch so einfach wie möglich zu gestalten ist es wünschenswert, dass alle SONDENSÄTZE mit der gleichen Verstärkung gescannt und anschließend quantifiziert werden können. Für die SONDENSÄTZE der TEM- und SHV-Microarrays traf dies ohne Einschränkung zu.

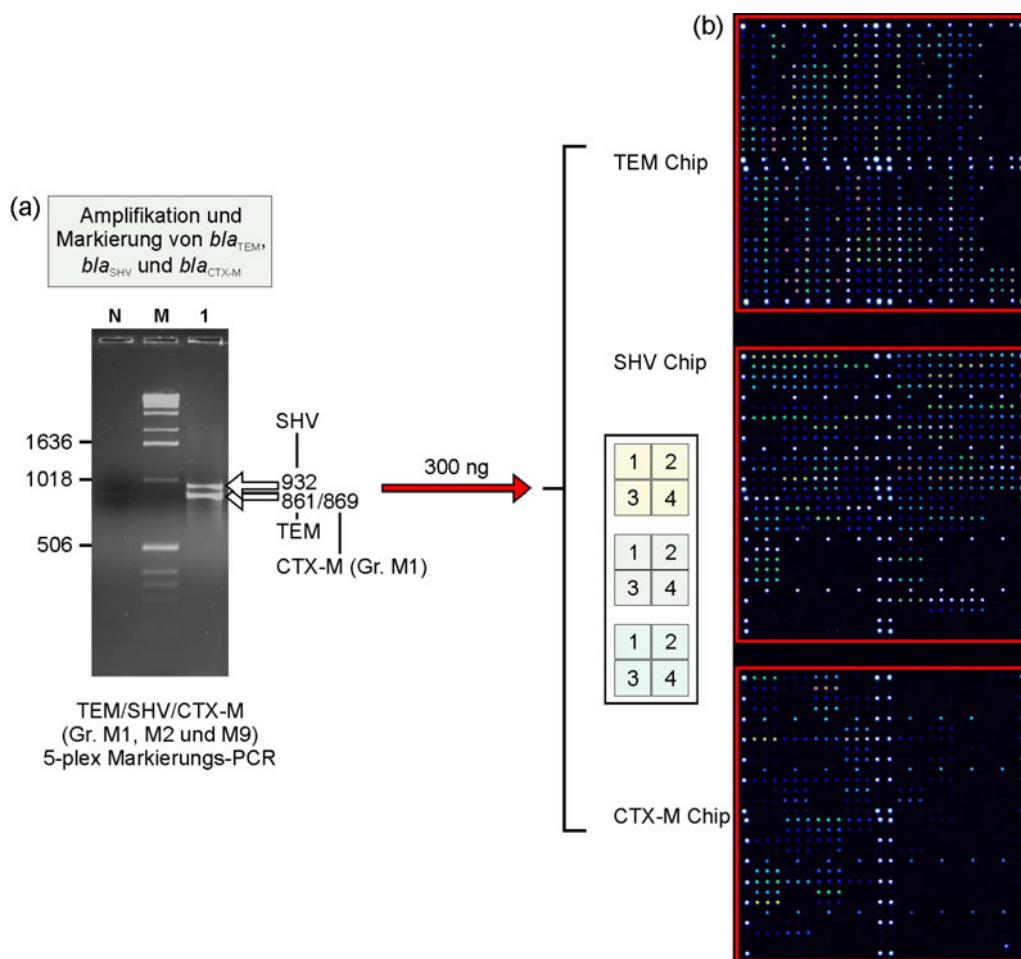


Abbildung 3-15: Integration dreier Chipmodule. (a) Ergebnis der TEM/SHV/CTX-M 5-plex Markierungs-PCR. M, DNA-Längenstandard; Spur 1, jeweils 50 ng Plasmid-DNA als *Template* von TEM 116, SHV-2 und CTX-M-15 (klinisches Isolat 14); N, Negativkontrolle. (b) Fluoreszenzbild des Dreifachchips-Chips nach Hybridisierung mit 300 ng des Multiplex PCR-Produkts (Spur 1, Einbaureate: 89 NT/Cy3) und schematische Darstellung der Subarray-Anordnung der Chipmodule. PE-Scanner-PMT: 70 %.

Analog zur Integration des TEM- und SHV-Microarrays wurde in einem nächsten Schritt der CTX-M-Microarray-Prototyp hinzugefügt. Für die Testhybridisierungen wurde eine Mischung aus $bla_{TEM-116^-}$, bla_{SHV-2^-} und $bla_{CTX-M-15^-}$ -Ziel-DNA verwendet, welche in einer Multiplex-PCR hergestellt wurde (Abbildung 3-15 a). Abbildung 3-15 b zeigt ein Fluoreszenzbild des TEM/SHV/CTX-M-Dreifach-Chips nach Hybridisierung mit 300 ng Ziel-DNA. Alle drei Chipmodule zeigten ähnliche Signalintensitäten der Perfekt Match-Sonden. Der I_{PM} -Wert der TEM-Sonden betrug ca. 15000 Intensitätseinheiten, der I_{PM} -Wert der SHV-Sonden ca. 20000. Das zusätzlich hinzugefügte CTX-M-Chipmodul zeigte einen Wert von ca. 13000 Intensitätseinheiten. Aufgrund der Herstellung der Ziel-DNA in einer Multiplex-PCR, war das Verhältnis der verschiedenen Ziel-DNA-Typen nicht bekannt. Da auch die Einbaureate für die

Ziel-DNA-Mischung berechnet wurde, waren die Einbauraten der einzelnen Ziel-DNA-Typen nicht bekannt. Trotz dieser Variationen bezüglich DNA-Menge und Einbaurate waren die Sonden aller drei Microarrayprototypen uneingeschränkt kompatibel.

Fazit: Die Integration der TEM-, SHV- und CTX-M-Sondensätze auf einem Objektträger und der zugehörigen Präanalytik war erfolgreich. Die gleichzeitige Hybridisierung aller Sondensätze unter denselben Bedingungen in einem Reaktionsraum mit Ziel-DNA-Mischungen war möglich. Die TEM-Sonden konnten auch ohne Aminomodifikation ausreichend an die Epoxy-funktionalisierte Trägeroberfläche gebunden werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit und im Hinblick auf andere *Slide*-Hersteller wurde zur Sicherheit die Kopplungsschemie der Sondensätze vereinheitlicht.

3.1.3.2. Integration und Umstellung des Herstellungsprozesses

Nachdem die Machbarkeit einer Integration der TEM-, SHV- und CTX-M-Microarrayprototypen gezeigt werden konnte, wurde in der zweiten Stufe der Microarray-Herstellungsprozess überarbeitet. Dabei wurden folgende Änderungen des Systems durchgeführt:

(I) Wechsel des Microarraysubstrats: Da die Herstellung der *Epoxy coated glass slides* (3D) eingestellt wurde, wurden als Alternative Epoxy-beschichtete Objektträger der Firma Schott (Nexterion Slide E) verwendet. Der Wechsel des Trägermaterials zog eine erneute Optimierung des Druckverfahrens nach sich. Unterschiedliche Oberflächeneigenschaften wirken sich beim Kontaktdruckverfahren vor allem auf die Spotmorphologie aus. Ziel der Optimierung waren homogene Spots mit einem Spotdurchmesser von ca. 120 μm . Da verschiedene Druckpuffer des Herstellers keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, wurde die Spotgröße und -Morphologie durch Zugabe verschiedener Triton X-100-Mengen optimiert. Schließlich wurde ein Druckpuffer (Nexterion Spot) mit einer Endkonzentration von 0,0075 % Triton X-100 verwendet.

(II) Homogenisierung des Sonden-Portfolios: Die Sequenzen aller TEM-Sonden wurden mit Aminomodifikationen versehen. Damit besaßen alle Sonden des Dreifach-Chips diese Funktionalisierung und sollten auf die gleiche Art und Weise mit den Epoxy-Gruppen der Objektträgeroberfläche reagieren. Die Aminomodifikation soll eine endständige Immobilisierung der Oligonukleotide ermöglichen und dadurch die Zugänglichkeit der Sonden verbessern. Dadurch sind Auswirkungen der Modifikation auf das Hybridisierungsverhalten von Sonden möglich.

(III) Umgestaltung des Layouts: Durch eine streifenförmige Anordnung der verschiedenen Module der Dreifach-Chips (jeweils 4 x 1 Subarrays) sollte das Layout für eine Erweiterung einzelnen Module vorbereitet werden. Weitere Subarrays können unterhalb der vorhandenen Subarrays angefügt werden. Zusätzlich wurde der Druckprozess für den 12 Subarrays umfassenden Chip umgestellt. Alle Subarrays wurden in einem einzigen Lauf mit insgesamt 8 Nadeln gedruckt. Sonden für weitere Subarrays oder Module können ebenfalls in diesen Lauf integriert werden. Das umgestaltete Layout ist in Abbildung 3-16 dargestellt.

Da nach dem Wechsel des Microarraysubstrats und der Optimierung des Druckverfahrens alle Sonden in optimiertem Druckpuffer verdünnt werden mussten, wurden der Austausch der TEM-Sonden und die Änderung des Chip-Layouts zum selben Zeitpunkt durchgeführt. Der umgestaltete Dreifach-Chip wurde unter anderem mit einer Mischung aus $bla_{\text{SHV-12}}$ - und $bla_{\text{CTX-M-9}}$ -Ziel-DNA getestet. Die bla_{SHV} - und $bla_{\text{CTX-M}}$ -Ziel-DNA wurde getrennt hergestellt (Abbildung 3-17 a). Abbildung 3-17 b zeigt ein Fluoreszenzbild des Microarrays nach Hybridisierung mit 200 ng Ziel-DNA. Auch nach den beschriebenen Umstellungen zeigten die verschiedenen Chipmodule ähnliche absolute Signalintensitäten und konnten auf der Basis desselben Scanbildes ausgewertet werden (einheitliche PMT). Die Kompatibilität der Sonden wurde durch die Umstellungen nicht beeinträchtigt.

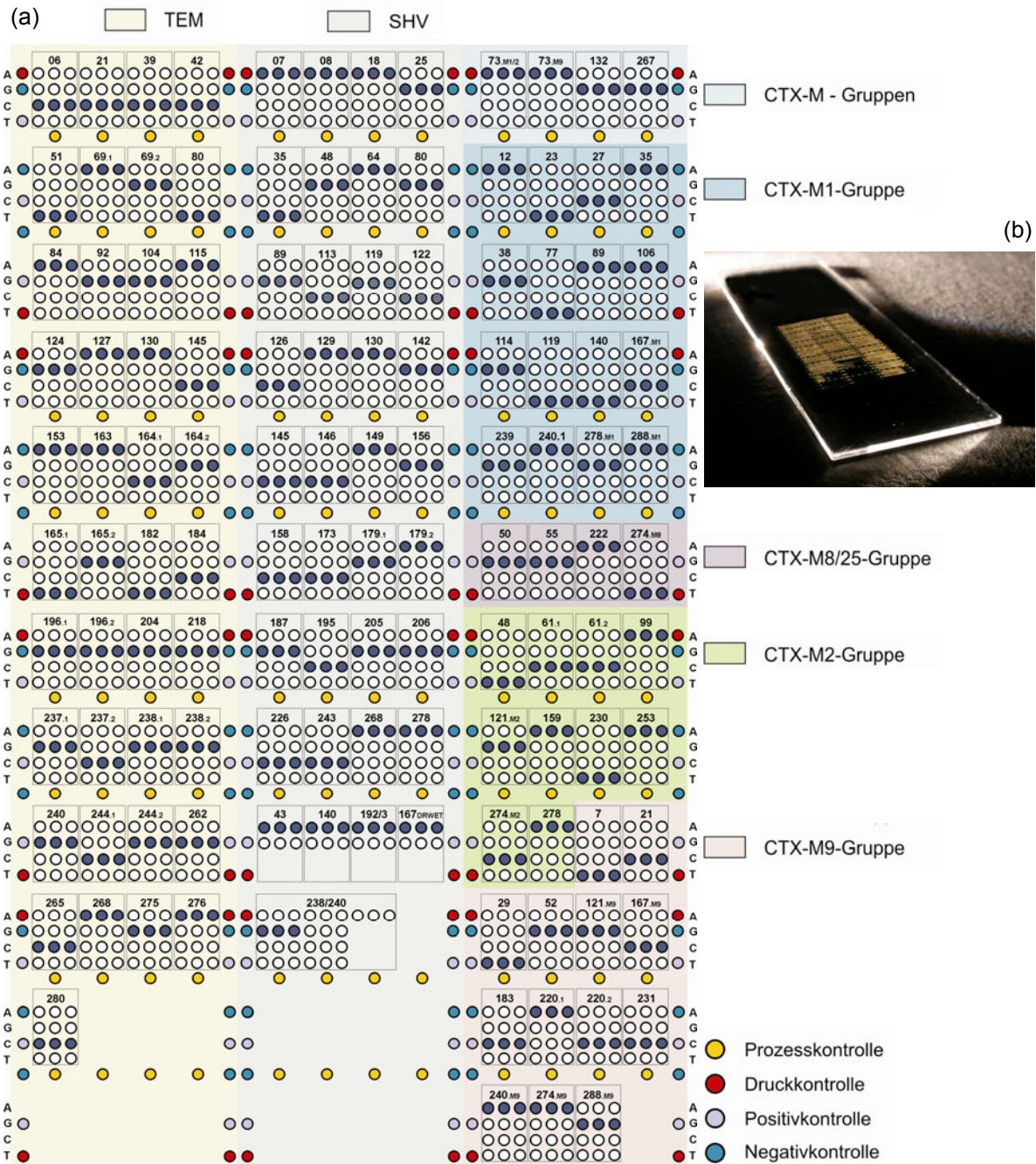


Abbildung 3-16: (a) Umgestaltetes Layout des Dreifach-Chips zur Genotypisierung von TEM-, SHV- und CTX-M- β -Lactamasegenen. Die für die verschiedenen β -Lactamase-familien und -Gruppen (bei CTX-M) spezifischen Bereiche sind farbig markiert. Ebenfalls farbig (dunkelblau) hervorgehoben sind die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit TEM-1, SHV-1, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 und CTX-M-9 Ziel-DNA. Die Prozesskontrollen der drei Chipmodule entsprechen Sonden zur Gruppenidentifizierung und detektieren entweder bla_{TEM} , bla_{SHV} oder bla_{CTX-M} . (b) Foto des Chips nach dem Spotten. Die Spots sind sichtbar, da man die noch vorhandenen Salzurückstände des Druckpuffers (werden beim Blocken entfernt) auf der Oberfläche sehen kann (Foto: Harald Peter).

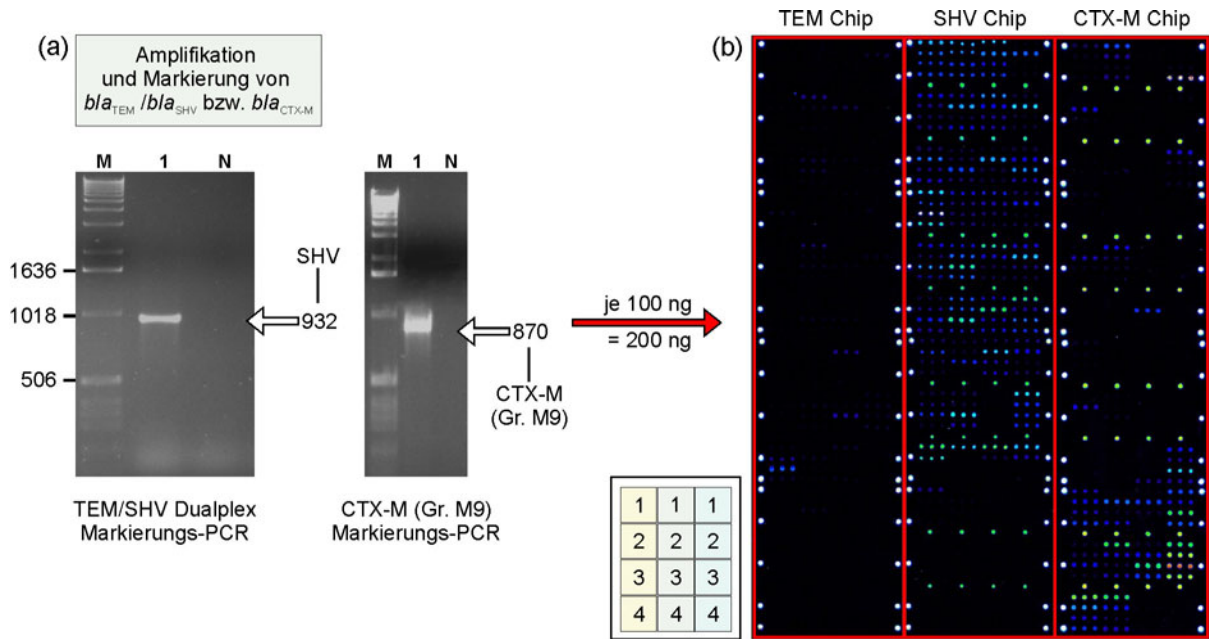


Abbildung 3-17: Integration dreier Chipmodule. (a) Ergebnis der getrennten Amplifikation von TEM/SHV- und CTX-M- β -Lactamasegenen. *Templates*: jeweils 100 ng *Enterobacter*-DNA (Referenzmaterial); M, DNA-Längenstandard; Spur 1, SHV-12 bzw. CTX-M-9; N, Negativkontrolle. (b) Fluoreszenzbild des neuen Dreifach-Chips nach Hybridisierung mit insgesamt 200 ng markiertem PCR-Produkt (Einbauraten: 91 NT/Cy3 bzw. 53 NT/Cy3) und schematische Darstellung der neu gestalteten Subarray-Anordnung der Chipmodule. PE-Scanner-PMT: 60 %.

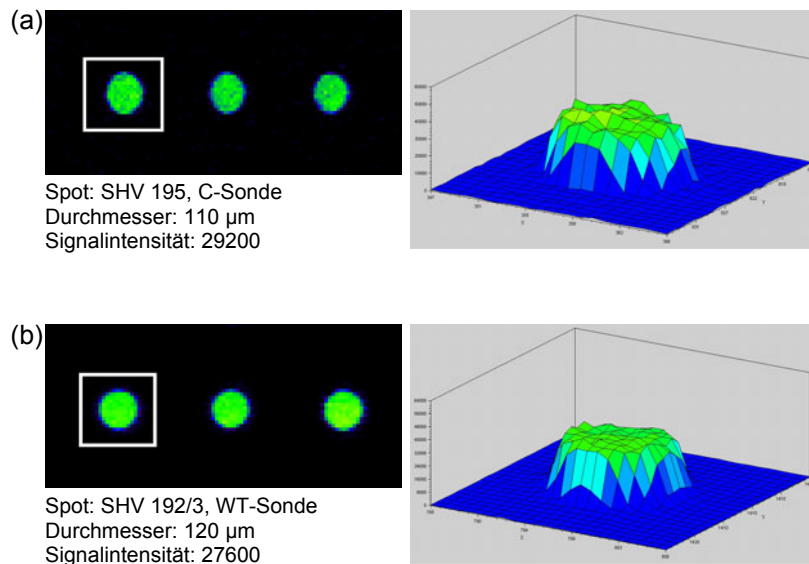


Abbildung 3-18: Vergleich der Spotmorphologie vor und nach Umstellung des Herstellungsprozesses. (a) Analyse eines Spots des TEM/SHV-Zweifach-Chips (Abbildung 3-14), (b) Analyse eines Spots des umgestalteten Dreifach-Chips (Abbildung 3-17). Software zur dreidimensionalen Darstellung der Spotintensitäten: ICS-501 Image Capture.

Zur Abschätzung der Qualität der Microarray-Herstellung vor und nach der Umstellung des Herstellungsprozesses wurde die Morphologie einiger Spots der in Abbildung 3-14 (TEM/SHV-Zweifach-Chip) und Abbildung 3-17 (umgestalteter Dreifach-Chip) gezeigten Microarrays untersucht. Abbildung 3-18 vergleicht beispielhaft zwei Spots, die nach der Hybridisierung ähnliche Signalintensitäten zeigten. Es konnten folgende Unterschiede bezüglich Spot-Homogenität und Größe beobachtet werden: (I) Die Verteilung der Signalintensitäten der einzelnen Pixel eines Spots war gleichmäßiger und (II) der mittlere Durchmesser aller Spots des jeweiligen Microarrays größer als zuvor. Die durchschnittliche Spotgröße des TEM/SHV-Zweifach-Chips betrug 112 μm , die des umgestalteten Dreifach-Chips 132 μm .

Fazit: Der Microarray-Herstellungsprozess wurde erfolgreich umgestellt. Das umgestaltete Layout bildete die Basis für Erweiterungen des Dreifach-Chips. Die Qualität der Microarrays war vor und nach der Umstellung vergleichbar. Die Homogenität der Spots war auf den neuen *Slides* besser, die Spotgröße befand sich im optimalen Bereich. Die genauen Auswirkungen der Systemänderungen auf die Leistungsfähigkeit der Sonden wurden durch zahlreiche Testhybridisierungen analysiert. Neben den Auswirkungen der Oberflächeneigenschaften der neuen *Slides* auf die Spotmorphologie, musste auch das Verhalten der Objektträger bei Hybridisierungen geprüft werden. Diese Analysen bildeten die Basis für die Optimierung der Hybridisierungsbedingungen (siehe 3.1.2).

3.1.4 Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule

Die Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule umfasste zwei Hauptaufgaben. Einerseits sollte das Portfolio an Sonden um Sondensätze zur Genotypisierung weiterer Positionen innerhalb des bla_{TEM} - bzw. bla_{SHV} -Gens erweitert werden. Ziel dieser Erweiterung war, die Identifikation aller zum Zeitpunkt des Sondendesigns bekannter bla_{TEM} - und bla_{SHV} -Allele zu gewährleisten. Andererseits sollte das Verhalten der vorhandenen TEM- und SHV-Sondensätze unter Anwendung der in Kapitel 3.1.2 optimierten Hybridisierungsbedingungen erneut analysiert und Sondensätze mit nicht ausreichender Leistung überarbeitet werden. Dieser Prozess wird im Folgenden als Sonden-Redesign bezeichnet.

Die verschiedenen Varianten der neu entwickelten bzw. überarbeiteten Sondensätze wurden in einem integrierten Testchip-Layout zusammengefasst und mit Hilfe von Testhybridisierungen mit TEM- und SHV-Referenzmaterial evaluiert. Eine Sondenauswahl wurde in das überarbeitete Dreifach-Chip-Layout integriert. Zur klaren Abgrenzung der verschiedenen Evolutionsstufen der Sondensätze wurde folgende Nomenklatur verwendet: (I) Für aktuelle TEM- und SHV-Sonden, wie sie im überarbeiteten Dreifach-Chip-Layout verwendet wurden (siehe 3.1.3), und für neu entwickelte Sonden zur Erweiterung dieser Module, werden keine Erweiterungen des Sondennamens verwendet (z. B. TEM 184). (II) Ältere Sondensatz-Versionen wurden mit der Erweiterung „original“ versehen (z. B. SHV 226_{original}) und (III) neu überarbeitete Sondensätze mit „Redesign“ oder R (z. B. SHV 238/240_{Redesign} oder TEM 184.R). (IV) Die Erweiterungen .a, .b und .c stehen für alternative Varianten der gleichen Evolutionsstufe (z. B. TEM 114.a und TEM 114.b).

3.1.4.1 Erweiterungen der TEM- und SHV-Chipmodule

Die Recherche nach verfügbaren Nukleotidsequenzen verschiedener bla_{TEM} und bla_{SHV} -Allele in öffentlichen Sequenz-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Abgleich mit der als Referenz verwendeten Internetseite der Lahey-Klinik (<http://www.lahey.org/studies>) führte zur Identifikation von insgesamt 23 weiteren Polymorphismen in bla_{TEM} und bla_{SHV} (siehe Tabelle 3-3). Die im aktuellen Sonden-Portfolio noch nicht enthaltenen Substitutionen an Position 4 und 5 von bla_{TEM} (innerhalb des Signalpeptids) wurden nicht berücksichtigt, da diese von den in dieser Arbeit verwendeten Primern nicht abgedeckt werden. Sie sind daher auch nicht in Tabelle 3-3 enthalten. Bei der Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule

wurden insgesamt 22 der 23 Polymorphismen berücksichtigt. Wie bereits zuvor (Grimm 2005) wurde die Deletion der Aminosäure 54 bei SHV-9 und SHV-10 aufgrund nachteiliger Sekundärstrukturen möglicher Sonden nicht berücksichtigt. SHV-9 und SHV-10 können aber aufgrund des Aminosäureaustausche Ala140Arg bzw. Ser130Gly identifiziert werden. Für die Genotypisierung der relevanten Mutation stehen bereits Sondensätze zur Verfügung. Somit wurden Sonden zur Genotypisierung von jeweils 11 weiteren Mutationen des *bla*_{TEM}- und *bla*_{SHV}-Gens entworfen. 21 der 22 Aminosäure-Substitutionen beruhen auf Punktmutationen. Für diese Positionen sollten Sondensätze zur allelspezifischen Hybridisierung mit vier Sonden entworfen werden. Nur die Substitution Asp35Pro in *bla*_{TEM} wird durch den Austausch zweier Nukleotide verursacht. Für diese Position wurde ein Sondensatz mit nur zwei Sonden entworfen. Eine der Sonden ist spezifisch für TEM-1 (Wildtyp, WT), die andere für TEM-130 (Mutante, MUT).

Tabelle 3-3: Polymorphismen der TEM- und SHV-β-Lactamasen, die bei der Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule berücksichtigt wurden.

Nucleotid			Aminosäure ^a			Phenotyp ^b			
Position ^c	Codon in:		Ambler Position	Aminosäure in		ESBL	IRT	CMT	n.d.
	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{TEM-X}		TEM-1	TEM-X				
40	TTT	CTT	16	F	L			125	
94	AAA	GAA	34	K	E				141
97-98	GAT	CCT	35	D	P	130			
334	ACG	CCG	114	T	P	147			
465	GAT	GAG	157	D	E				128
466	CAT	AAT	158	H	N				127
511	ATA	GTA	173	I	V	132			
548	AAC	ATC	175	N	I	138			
531	GAC	GAA	179	D	E	126			
655	CTG	ATG	221	L	M		145		
665	CCC	GTC	224	A	V	147			
Position ^c	<i>bla</i> _{SHV-1}	<i>bla</i> _{SHV-X}	Ambler Position	SHV-1	SHV-X	ESBL	IRT	CMT	n.d.
17	CTG	CGG	10	L	R				61
43	CTG	ATG	19	L	M				85
146-148	GCG	-	54	G	-	9		10	
169	CGC	TGC	61	R	C				67
195	ATG	ATA	69	M	I			49	
322	CAC	TAC	112	H	Y				62
328	GCC	ACC	114	A	T				69
358	GCC	ACC	124	A	T				65
389	GCC	GTC	134	A	V				59
430	TTG	GTG	148	L	V				70
512	GGC	GCC	175	G	A				51
788	CCG	CTG	269	P	L				59

^a Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte nach Ambler (Ambler et al. 1991). Die Aminosäuren an den jeweiligen Positionen von TEM-1 und SHV-1 und die der entsprechenden TEM- bzw. SHV-Varianten (TEM-X, SHV-X), sind ebenfalls angegeben.

^b Die Nummern in diesen Tabellenspalten entsprechen den TEM- bzw. SHV-Varianten, für die Aminosäureaustausche an den entsprechenden Positionen beschrieben wurden (<http://www.lahey.org/studies>).

^c Diese Nummern beschreiben die Positionen der Polymorphismen in der Nukleotidsequenzen der *bla*_{TEM}- bzw. *bla*_{SHV}- Gene (TEM: GenBank accession number J01749, Region 3293-4153; SHV: GenBank accession number X98099, Region: 74-934).

Insgesamt wurden für die Genotypisierung der 22 Positionen 41 Sondensätze entworfen (siehe Tabelle 3-4). Die berechneten Schmelztemperaturen der Sonden betragen 48,1 - 60,9 °C. Für 7 der 22 Positionen (TEM 16, TEM 34, TEM 35, TEM 175, SHV 10, SHV 69 und SHV 112) konnten Sonden entworfen werden, die die in Kapitel 2.2.2 definierten strengen Anforderungen bezüglich Schmelztemperatur und Sekundärstrukturen erfüllen (T_M : $53 \pm 3,5$ °C; $\Delta G_{\text{Haarnadel}} \geq 0$ kcal/mol and $\Delta G_{\text{Dimer}} \geq -6$ kcal/mol). Für weitere 3 Positionen (TEM 158, TEM 173, SHV 69) konnten Sonden entworfen werden, die folgende Sekundärstruktur-Parameter erfüllen: $\Delta G_{\text{Haarnadel}} \geq -0,5$ kcal/mol and $\Delta G_{\text{Dimer}} \geq -8$ kcal/mol. Dieser erweiterte Bereich umfasst jedoch immer noch unkritische Werte. Für den Sondensatz SHV 19 wurden Schmelztemperaturen von bis zu 59,1 °C erlaubt. Für die restlichen 11 Positionen innerhalb der bla_{TEM} - und bla_{SHV} -Gensequenzen (TEM 114, TEM 157, TEM 179, TEM 221, TEM 224, SHV 61, SHV 124, SHV 134, SHV 148, SHV 175 und SHV 269) war es nicht möglich, Sonden mit optimalen thermodynamischen Parametern zu entwickeln. Während bei den Positionen TEM 114, TEM 157, TEM 179, SHV 148 und SHV 175 hauptsächlich Probleme mit der Ausbildung von Haarnadel-Strukturen auftraten, waren die Positionen TEM 221, TEM 224, SHV 61, SHV 124, SHV 134 und SHV 269 vor allem von Dimeren betroffen (siehe Tabelle 3-4).

Schmelztemperaturen und mögliche Sekundärstrukturen basieren auf der Abfolge der verschiedenen Basen und sind somit intrinsisch für einen bestimmten Sequenzabschnitt. Wenn während des Sondendesigns das Arsenal an Variationsmöglichkeiten (Länge, Position) ausgeschöpft war, ohne eine deutliche Verbesserung der Sondereigenschaften zu erzielen, wurde in dieser Arbeit ein alternatives Sondendesign angewandt. In Sondensequenzen, die von starken Sekundärstrukturen betroffen waren, wurden künstliche Fehlpaarungen zu den Ziel-Sequenzen eingefügt. Diese Mismatches wurden an Nukleotidpositionen eingefügt, die zentrale Rollen bei der Ausbildung dieser Sekundärstrukturen spielen. Das Ziel war, die Stabilität dieser Strukturen zu verringern. Die hierdurch verursachte Verringerung der Hybridisierungseffektivität musste meist durch eine Verlängerung der ursprünglichen Sonde kompensiert werden. Dieses alternative Sondendesign wurde für 8 der 11 Positionen angewandt (TEM 114, TEM 179, TEM 221, TEM 224, SHV 61, SHV 134, SHV 175 und SHV 269). Die Sonden für die Positionen TEM 157, SHV 124 und SHV 148 wurden nicht modifiziert. Im Falle von SHV 148 konnte ein Mismatch die Ausbildung von Haarnadel-Strukturen nicht verhindern. Für diesen Sondensatz wurde nur ein Sondensatz entwickelt. Für TEM 157 und SHV 124 wurden zusätzliche, konservativ entwickelte Sondensätze getestet.

Tabelle 3-4: Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV- Chipmodule.

Sondenname ^a	Sondensequenz ^b (5'-3')	Länge ^c	T_M ^d (°C)	Haarnadel ΔG^e (kcal/mol)	Dimer ΔG^e (kcal/mol)
<i>bla</i> _{TEM} – spezifische Sonden					
TEM 16	TATTCCTTT N TTGCGGCAT	20	53.1	1.11	-5.09
TEM 34	GGTGAAGT ANA AGATGCTGAA	22	51.2	0.93	-3.14
TEM 35 _{WT}	TGAAAGTAAAA GAT GCTGAAGAT	23	50.3	0.93	-3.14
TEM 35 _{MUT}	TGAAAGTAAAA CCT GCTGAAGAT	23	52.5	0.01	-3.14
	AGCATCTT A CGGATGGC	17	52.0	-2.49	-5.0
TEM 114.a	AGCATCTT G CGGATGGC	17	56.0	-2.49	-5.09
	AGCATCTT C CGGATGGC	17	55.1	-2.49	-12.9
	AGCATCTT T CGGATGGC	17	52.6	-2.49	-5
	AAAAGCT T CTT A CGGATGGCA	21	50.4	-0.35	-10.23
TEM 114.b	AAAAGCT T CTT G CGGATGGCA	21	53.8	-1.47	-10.23
	AAAAGCT T CTT C CGGATGGCA	21	53.0	-0.35	-12.9
	AAAAGCT T CTT T CGGATGGCA	21	50.9	-0.35	-10.23

Ergebnisse

Sondenname ^a	Sondensequenz ^b (5'-3')	Länge ^c	T _M ^d (°C)	Haarnadel ΔG ^e (kcal/mol)	Dimer ΔG ^e (kcal/mol)
TEM 114.c	AAAAGCTTCTT <u>AC</u> GGATGGC	20	48.6	0.5	-10.23
	AAAAGCTTCTT <u>GCG</u> GATGGC	20	52.1	-0.64	-10.23
	AAAAGCTTCTT <u>CCG</u> GATGGC	20	51.3	-0.07	-12.9
	AAAAGCTTCTT <u>T</u> CGGATGGC	20	49.1	-0.09	-10.23
TEM 157.a	TGGGGG <u>AA</u> CATGTAAGTC	18	51.4	1.27	-8.07
	TGGGGG <u>GAG</u> CATGTAAGTC	18	54.1	0.09	-5.38
	TGGGGG <u>ACC</u> CATGTAAGTC	18	53.8	-2.07	-5.38
	TGGGGG <u>AT</u> CATGTAAGTC	18	50.9	0.85	-5.38
TEM 157.b ^{WT}	ATGGGG <u>AT</u> CATGTAAGTC	19	51.3	0.85	-5.38
TEM 157.b ^{MUT}	ATGGGG <u>GAG</u> CATGTAAGTC	19	54.3	0.09	-5.38
TEM 158	ATGGGGGAT <u>NAT</u> GTAAGTCG	20	54.1	-0.13	-5.38
TEM 173	TGAATGAAGCC <u>NTA</u> CCAAAC	20	50.7	-0.45	-3.43
TEM 175	CCATACCA <u>ANC</u> GACGAGC	18	53.5	-*	-3.61
TEM 179.a	ACGAGCGT <u>GAA</u> ACCAC	16	52.7	0.14	-4.95
	ACGAGCGT <u>GAG</u> ACCAC	16	54.6	-0.56	-4.95
	ACGAGCGT <u>GAC</u> ACCAC	16	55.3	-0.56	-4.95
	ACGAGCGT <u>GAT</u> ACCAC	16	51.5	-0.56	-4.95
	ACGAGCGT <u>GAA</u> ACCATGAT	19	52.2	0.33	-5.38
TEM 179.b	ACGAGCGT <u>GAG</u> ACCATGAT	19	54.0	-0.37	-5.38
	ACGAGCGT <u>GAC</u> ACCATGAT	19	54.5	-0.37	-5.38
	ACGAGCGT <u>GAT</u> ACCATGAT	19	51.1	-0.37	-5.38
TEM 179.c ^{WT}	CGAGCGT <u>GAC</u> ACCATGA	17	53.5	-0.37	-5.38
TEM 179.c ^{MUT}	CGAGCGT <u>GAA</u> ACCATGA	17	49.9	0.33	-5.38
TEM 221.a	ACCACTT <u>AT</u> GCGCTCG	16	52.2	0.74	-9.89
	ACCACTT <u>GT</u> GCGCTCG	16	56.0	-0.56	-9.89
	ACCACTT <u>CT</u> GCGCTCG	16	55.4	1.19	-9.89
	ACCACTT <u>TT</u> GCGCTCG	16	53.4	1.07	-9.89
TEM 221.b	GGACCACTT <u>AT</u> GCGTTCG	18	50.2	0.74	-3.61
	GGACCACTT <u>GT</u> GCGTTCG	18	53.7	-0.56	-3.61
	GGACCACTT <u>CT</u> GCGTTCG	18	53.1	0.53	-3.61
	GGACCACTT <u>TT</u> GCGTTCG	18	51.3	1.07	-3.61
TEM 224.a	GCGCTCG <u>GAC</u> CCTTC	14	53.2	1.45	-9.89
	GCGCTCG <u>GGC</u> CCTTC	14	57.4	-0.48	-9.89
	GCGCTCG <u>GC</u> CCTTC	14	57.4	-0.24	-9.89
	GCGCTCG <u>GT</u> CCTTC	14	53.2	1.12	-9.89
TEM 224.b	TGT <u>TC</u> GCTCG <u>GAC</u> CCTTC	17	49.5	0.84	-3.61
	TGT <u>TC</u> GCTCG <u>GGC</u> CCTTC	17	53.5	-0.48	-9.28
	TGT <u>TC</u> GCTCG <u>GC</u> CCTTC	17	53.5	0.61	-9.28
	TGT <u>TC</u> GCTCG <u>GT</u> CCTTC	17	49.5	1.17	-3.61
TEM 224.c ^{WT}	TGCGCTCG <u>GC</u> CCTTC	15	59.1	-0.85	-9.89
TEM 224.c ^{MUT}	TGCGCTCG <u>GT</u> CCTTC	15	55.1	1.12	-9.89
<i>bla_{SHV}</i> – spezifische Sonden					
SHV 10	GTTATATT <u>CGCC</u> NGTGTATTATCT	24	50.4	1.15	-3.91
SHV 19	TAGCCACC <u>NTG</u> CCGC	15	58.6	0.11	-3.61
	CCTGG <u>AGC</u> GCCGATG	15	56.5	0.1	-9.89
SHV 61.a	CCTGG <u>GGC</u> GCCGATG	15	60.2	-0.17	-16.03
	CCTGG <u>CCG</u> GCCGATG	15	60.9	-0.34	-22.78
	CCTGGT <u>GCG</u> GCCGATG	15	57.2	-0.04	-9.89
SHV 61.b	GCCTGG <u>AGT</u> GCCGAT	15	52.1	0.1	-3.61
	GCCTGG <u>GGT</u> GCCGAT	15	56.1	-0.17	-3.61
	GCCTGG <u>CGT</u> GCCGAT	15	57.1	-0.34	-6.21
	GCCTGGT <u>G</u> GCCGAT	15	52.8	-0.04	-3.61

Sondenname ^a	Sondensequenz ^b (5'-3')	Länge ^c	T _M ^d (°C)	Haarnadel ΔG ^e (kcal/mol)	Dimer ΔG ^e (kcal/mol)
SHV 61.C _{WT}	CGCCTGGCGCTCCGAT	16	56.9	-1.07	-9.89
SHV 61.C _{MUT}	CGCCTGGTGC T CCGAT	16	52.8	-0.66	-3.61
SHV 69	TTCCCATGAT N AGCACCTTT	20	54.3	0.58	-5.38
SHV 112	CAGCGAAAA N ACCTTGCC	19	55.2	0.16	-3.61
SHV 112.SM _{WT}	TCAGCGAAAA C ATCTTGCC	20	54.0	0.16	-3.61
SHV 112.SM _{MUT}	TCAGCGAAAA T ATCTTGCC	20	51.0	0.16	-3.91
SHV 114	AAACACCT T NCCGACGG	17	56.0	0.68	-6.68
SHV 114.SM _{WT}	GAAAAACATCT T GCCGACGG	20	54.7	0.88	-6.68
SHV 114.SM _{MUT}	GAAAAACATCT T ACC G ACGG	20	51.4	0.61	-6.68
	AACTCTGC A CCGCCG	15	55.8	0.32	-7.05
	AACTCTGC G CCGCCG	15	59.6	-0.21	-9.89
SHV 124.a	AACTCTGC C CCGCCG	15	58.8	0.32	-3.61
	AACTCTGC T CCGCCG	15	55.2	0.32	-3.61
SHV 124.b _{WT}	AACTCTGC G CCGCC	14	56.4	0.32	-9.89
SHV 124.b _{MUT}	AACTCTGC A CCGCC	14	52.2	0.32	-7.05
	TAACAGCG A CGCCAATC	17	52.7	0.39	-6.75
SHV 134.a	TAACAGCG G CGCCAATC	17	56.1	0.39	-16.03
	TAACAGCG C CGCCAATC	17	56.1	0.39	-9.89
	TAACAGCG T CGCCAATC	17	52.7	0.39	-6.75
SHV 134.b _{WT}	ATAACAT C CGCGCCAATCTG	20	51.3	1.47	-3.61
SHV 134.b _{MUT}	ATAACAT T CGCGCCAATCTG	20	48.1	1.47	-3.61
SHV 134.C _{WT}	ATAACAT C CGCGCCAATCTGC	21	54.5	0.56	-3.61
SHV 134.C _{MUT}	ATAACAT T CGCGCCAATCTGC	21	51.5	0.56	-3.61
SHV 148	CCCGCAGG A NTGACTG	16	53.1	-1.7	-3.61
SHV 175.a _{WT}	GCTTCCCG G CGACGC	15	60.8	-1.6	-9.75
SHV 175.a _{MUT}	GCTTCCCG C CGACGC	15	60.8	-0.45	-3.61
SHV 175.b _{WT}	CTTCCCG G CGACGC	14	57.2	-1.6	-9.75
SHV 175.b _{MUT}	CTTCCCG C CGACGC	14	57.2	-0.45	-3.61
SHV 175.C _{WT}	GCTTCCCG G CGACTCC	16	54.0	0.3	-9.75
SHV 175.C _{MUT}	GCTTCCCG C CGACTCC	16	54.0	0.04	-3.61
SHV 175.d _{WT}	GCTTCC T GGCGACGC	15	54.8	0.53	-6.75
SHV 175.d _{MUT}	GCTTCC T GCCGACGC	15	54.8	-0.33	-3.61
	GATACCC A GGCGAGCAT	17	54.5	2.7	-3.61
SHV 269.a	GATACCC G GGCGAGCAT	17	57.6	2.7	-15.89
	GATACCC C GGCGAGCAT	17	57.2	2.7	-9.75
	GATACCC T GGCGAGCAT	17	54.5	0.54	-3.61
	GGATACCC A CTCGAGCATG	19	49.8	-0.07	-6.76
SHV 269.b	GGATACCC G GTCGAGCATG	19	53.0	0.75	-9.75
	GGATACCC C GTCGAGCATG	19	53.0	0.55	-6.76
	GGATACCC T GTCGAGCATG	19	49.8	0.24	-6.76

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: WT, Wildtyp; MUT, Mutante; .a, .b, .c, verschiedene Varianten eines bestimmten Sondensatzes; SM, stille Mutation.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Relevante Mutationen (fett) bzw. zusätzliche Mismatches (blau) sind hervorgehoben und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer berechnet. Für Sonden mit zusätzlichen künstlichen Mismatches wurde die T_M-Mismatch berechnet.

^e Die Stabilität von Sekundärstrukturen (Haarnadel und Dimer) wird als Wert der freien Energie ΔG angegeben und wurde ebenfalls mit OligoAnalyzer berechnet. * Das in OligoAnalyzer implementierte mFold konnte für diese Sequenz keine Strukturen berechnen.

Die genauen Auswirkungen künstlicher Fehlpaarungen sind in silico schwierig abzuschätzen. Um bei Testhybridisierungen verschiedene Sondensätze für dieselbe Position vergleichen zu können, wurden für die meisten problematischen Positionen gleich mehrere verschiedene Sondensätze entworfen (.a, .b, usw.). Normalerweise handelte es sich um einen konservativ entworfenen Sondensatz, einen wie eben beschrieben modifizierten Sondensatz und evtl. zusätzliche Varianten. Aus Kostengründen wurden für die zusätzlichen Varianten meist nur zwei Sonden (WT, MUT) bestellt. Für die Positionen SHV 112 und SHV 114 wurden zusätzliche Sondenversionen entworfen, die eine häufige stille Mutation innerhalb der SONDENSEQUENZ berücksichtigen (.SM).

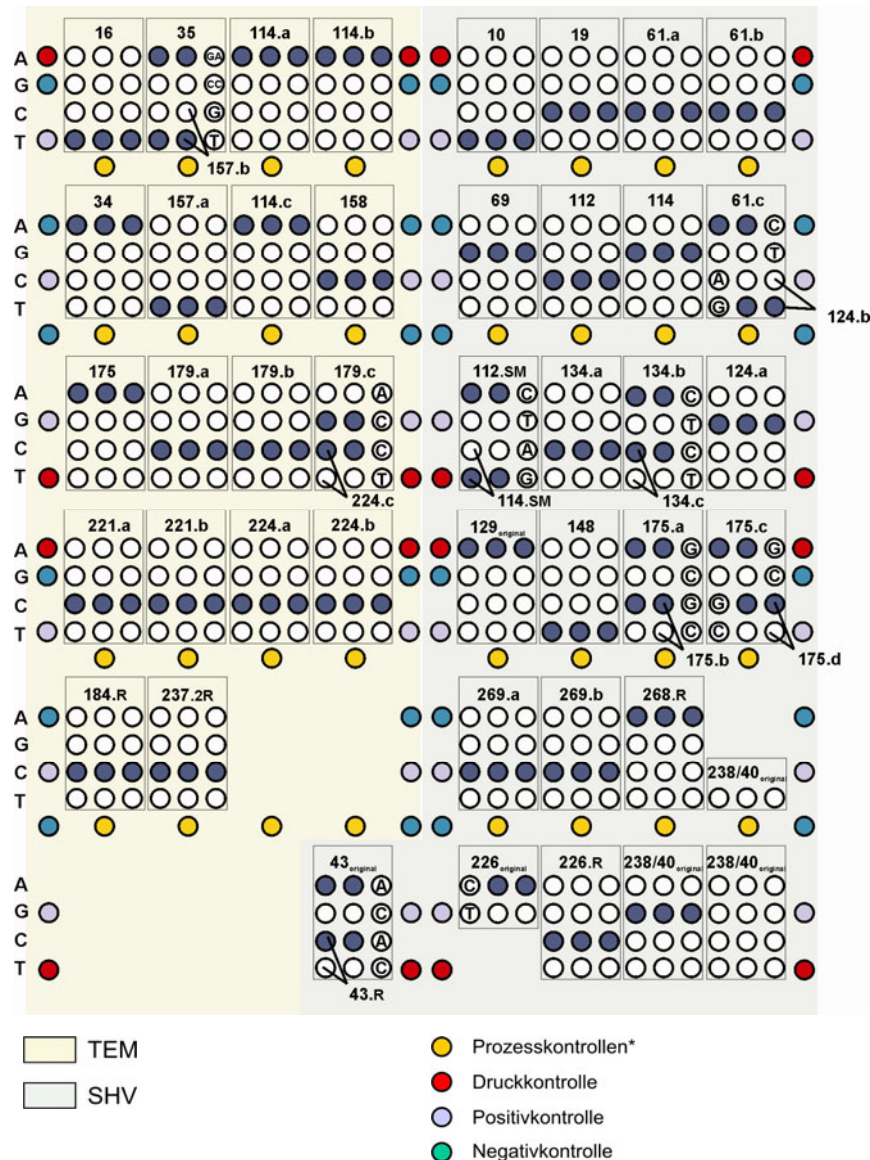


Abbildung 3-19: Layout des Testchips zur Evaluierung der Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule. Die für die verschiedenen β -Lactamasen spezifischen Bereiche sind farbig markiert. Ebenfalls farbig (dunkelblau) hervorgehoben sind die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit TEM-1 bzw. SHV-1. Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: .a, .b, .c, verschiedene Varianten eines bestimmten Sondensatzes; .SM, stille Mutation; original, ursprünglicher Sondenentwurf; .R, Redesign. Bei Sondensätzen, die aus zwei Sonden bestehen (WT, MUT), wurden die relevanten Nukleotide angegeben. *Die Prozesskontrollen entsprechen Sonden zur Identifizierung der detektierten β -Lactamasegene.

Abbildung 3-19 zeigt das integrierte Testchip-Layout zur Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule. Das Layout enthält sowohl die verschiedenen Varianten der neu entwickelten Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule als auch die Sondensätze, die während des Sonden-Redesigns betrachtet wurden (siehe Tabelle 3-5). Zur Analyse der Sondensätze wurden Testhybridisierungen mit TEM- und SHV-Referenzmaterial durchgeführt. Jeweils 100 ng TEM-3 bzw. SHV-1-Ziel-DNA wurden entweder gleichzeitig oder einzeln unter optimierten Bedingungen automatisiert hybridisiert. Die Verwendung der verschiedenen Ziel-Gene einzeln oder gleichzeitig diente der Abschätzung von Kreuzhybridisierungen und deren Einfluss auf das Diskriminierungsvermögen betroffener Sondensätze. Während Abbildung 3-20 Fluoreszenzbilder dieser Experimente zeigt, ist in Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22 die Auswertung der Fluoreszenzsignale dargestellt. Abbildung 3-21 zeigt die absoluten Signalintensitäten (I) und deren Standardabweichung, Abbildung 3-22 die relativen Signalintensitäten (RI) und deren Standardabweichung. In beiden Schaubildern wurden die Ergebnisse der gleichzeitigen Hybridisierung beider Ziel-Gene (farbige Säulen) und die Ergebnisse nach Hybridisierung mit bla_{TEM^-} bzw. bla_{SHV^-} -Ziel-DNA einzeln (gemusterte Säulen) aufgetragen.

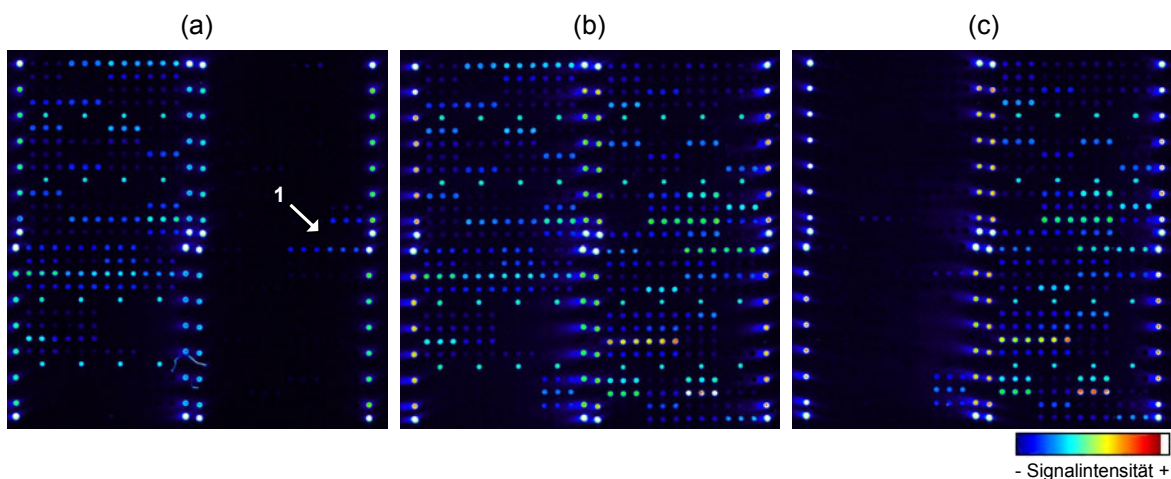


Abbildung 3-20: Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit je 100 ng markierter Ziel-DNA von (a) TEM-3 (TEM-3-Referenz, Einbaurate: 62 NT/Cy3), (b) TEM-3 und SHV-1 (SHV-1-Referenz, Einbaurate: 65 NT/Cy3) und (c) SHV-1. Für alle Fluoreszenzbilder: PE-Scanner-PMT: 60 %. (1) Kreuzhybridisierungssignale der SHV 175.a, SHV 175.c und SHV 124.a Sondensätze nach Hybridisierung mit TEM-Ziel-DNA.

Da die Sonden des Sondensatzes TEM 173 aufgrund einer verspäteten Lieferung nicht für die Integration in das Testchip-Layout zur Verfügung standen, wurde dieser Sondensatz getrennt evaluiert. Zur Analyse des Sondensatzes wurden Hybridisierungen mit 100 ng TEM-1-Ziel-DNA unter den gleichen Bedingungen wie die Hybridisierungen des oben beschriebenen Testchips durchgeführt. Die Evaluierung von TEM 173 ist in Abbildung 3-23 dargestellt.

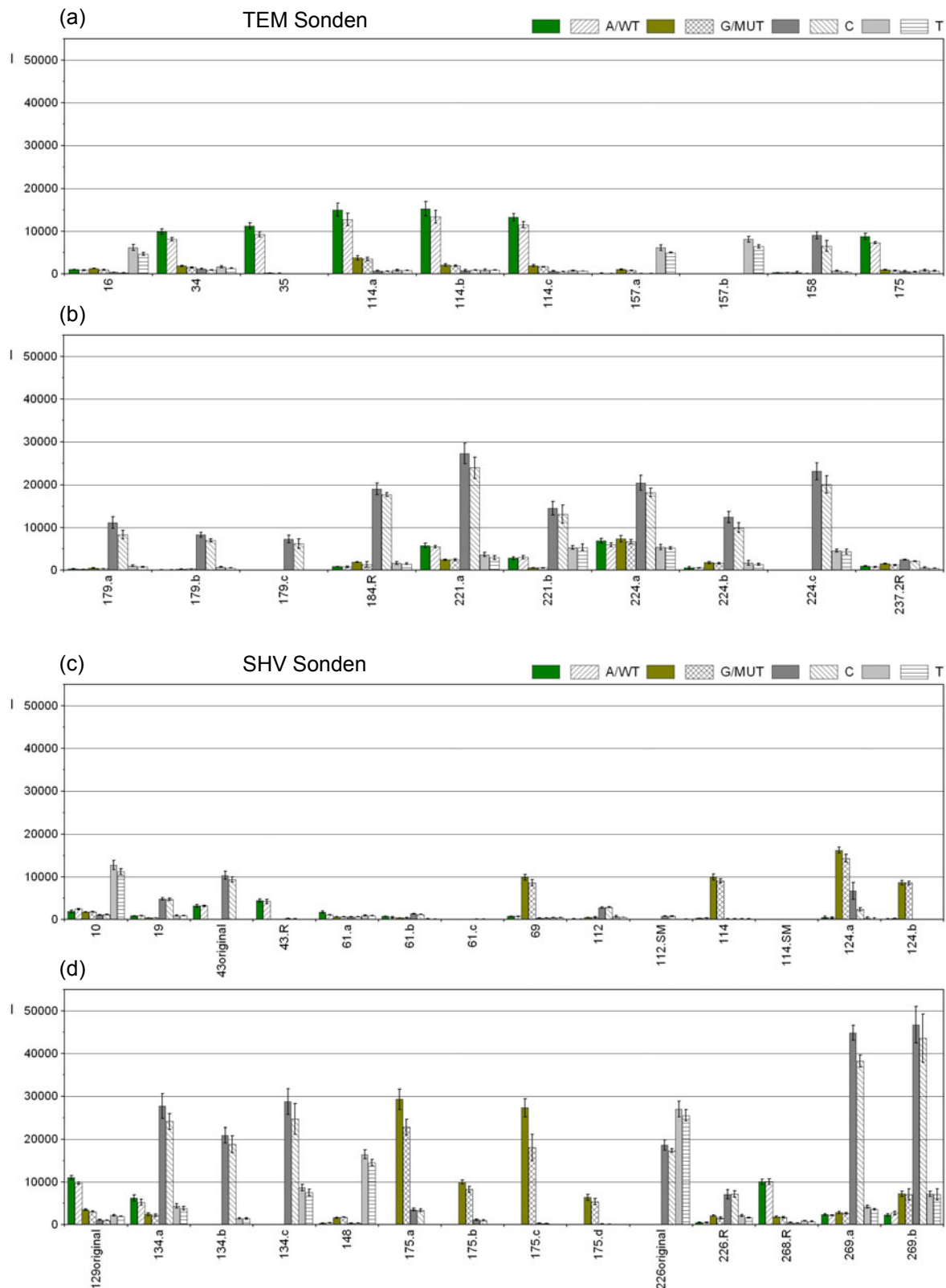


Abbildung 3-21: Signalintensitäten (I) der TEM- bzw. SHV-spezifischen SONDENSÄTZE des Testchips (a, b bzw. c, d) nach gleichzeitiger Hybridisierung mit markierter TEM-3 und SHV-1 Ziel-DNA (farbige Säulen). Die Ergebnisse nach Hybridisierung mit markierter TEM-3 (a, b) bzw. SHV-1 Ziel-DNA (c, d) alleine sind zum Vergleich als gemusterte Säulen dargestellt.

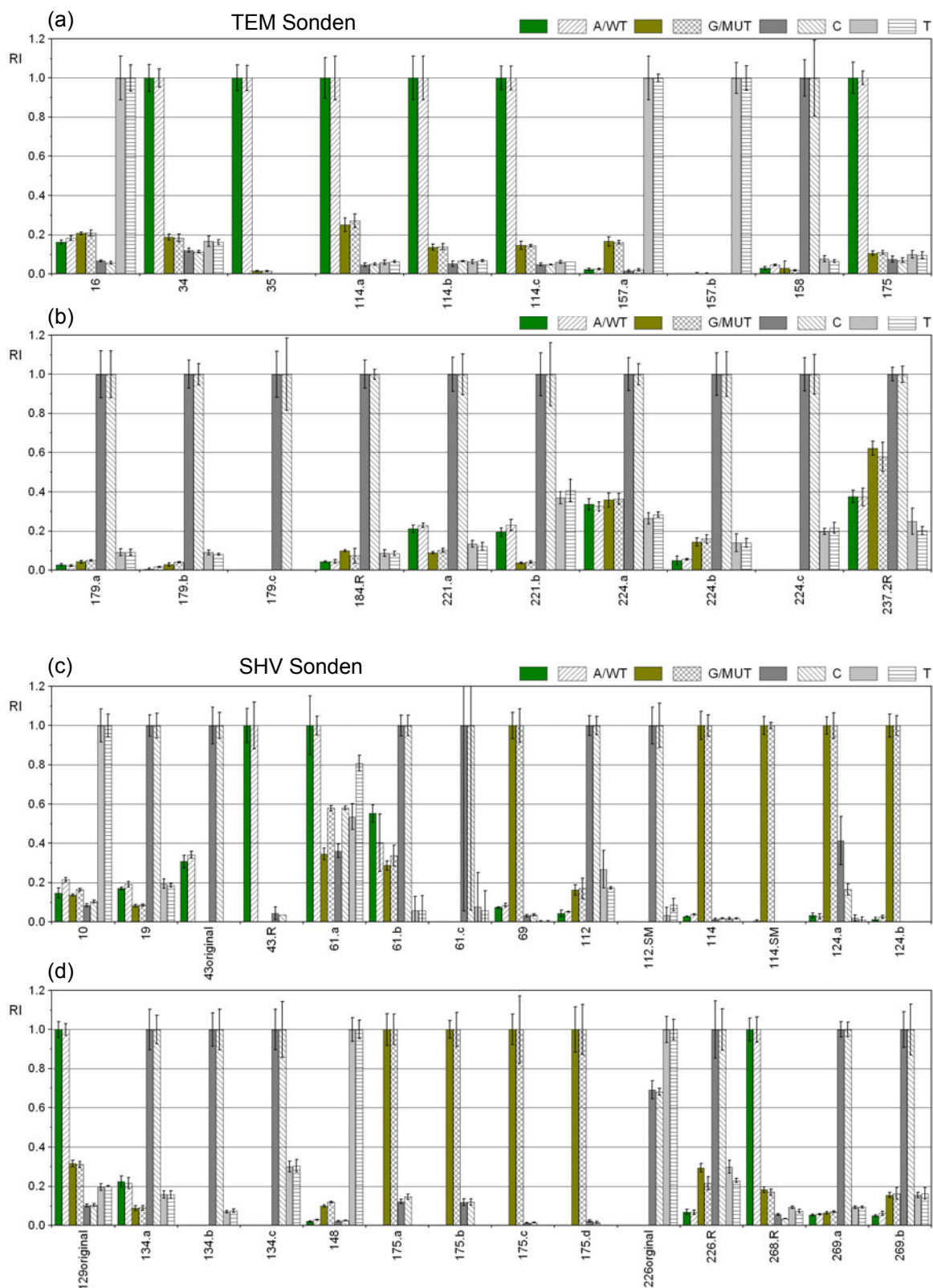


Abbildung 3-22: Relative Signalintensitäten (RI) der TEM- bzw. SHV-spezifischen Sondensätze des Testchips (a, b bzw. c, d) nach gleichzeitiger Hybridisierung mit markierter TEM-3 und SHV-1 Ziel-DNA (farbige Säulen). Die Ergebnisse nach Hybridisierung mit markierter TEM-3 (a, b) bzw. SHV-1 Ziel-DNA (c, d) alleine sind zum Vergleich als gemusterte Säulen dargestellt.

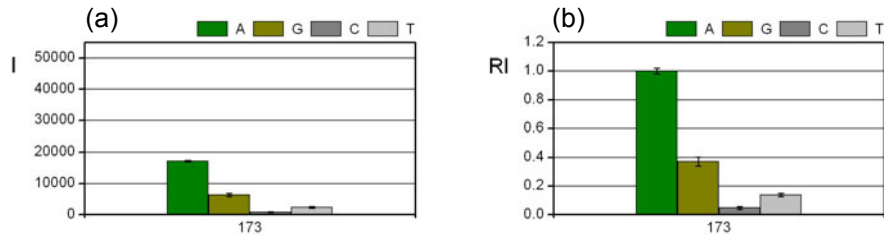


Abbildung 3-23: (a) Signalintensitäten (I) und (b) relative Signalintensitäten (RI) des Sondensatzes TEM 173 nach Hybridisierung mit markierter TEM-1 Ziel-DNA (Iso-15, 150ng, Einbaurate: 64 NT/Cy3).

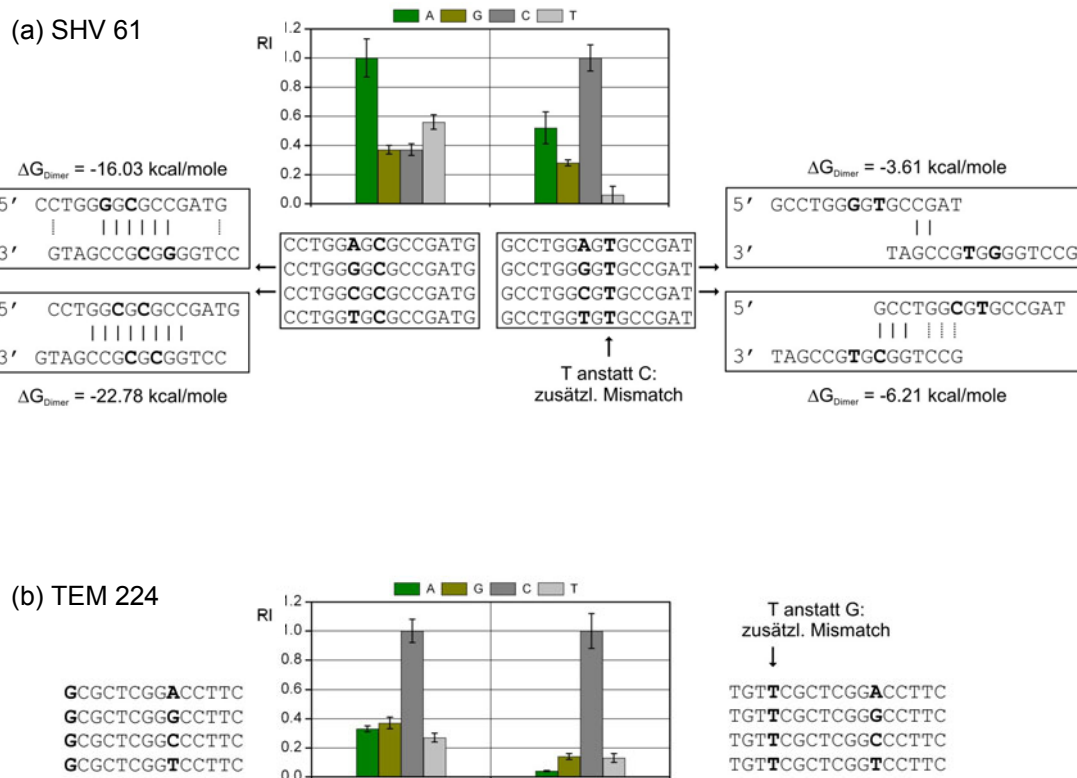


Abbildung 3-24: Sonden mit zusätzlichen künstlichen Mismatches. (a) Positiver Effekt des Mismatches an einer Position, die maßgeblich zur Ausbildung eines stabilen Dimers beiträgt, auf die Diskriminierungskapazität des Sondensatzes SHV 61. Die Modifikation des Sondensatzes ermöglichte die korrekte Identifizierung des untersuchten Nukleotids innerhalb der Ziel-DNA (PM = C). (b) Verbesserung der Eigenschaften von Sondensatz TEM 224. Relative Signalintensitäten nach gleichzeitiger Hybridisierung mit TEM-3 und SHV-1 Ziel-DNA (siehe Abbildung 3-22)

Vor der Analyse der verschiedenen Sondensätze zur Genotypisierung der 22 Polymorphismen und der endgültigen Auswahl der Sonden für die Erweiterung der beiden Chipmodule, soll der Effekt des alternativen Sondendesigns am Beispiel der Positionen SHV 61 und TEM 224 genauer betrachtet werden. Abbildung 3-24 a illustriert den positiven Einfluss einer Fehlpaarung an einer Position, die maßgeblich zur Ausbildung eines sehr stabilen Dimers beiträgt, auf die Diskriminierungskapazität des Sondensatzes SHV 61. Während die Hybridisierung der betroffenen G- und C-Sonden des unmodifizierten Sondensatzes eingeschränkt war und diese daher im Verhältnis zu schwache Signale lieferten (links, SHV 61.a), ermöglichte die Modifikation des Sondensatzes die korrekte Identifizierung des untersuchten Nukleotids innerhalb der Ziel-DNA (rechts, SHV 61.b, PM = C). Dieses Beispiel beschreibt den Einbau eines Mismatches zur Destabilisierung einer

ungünstigen Sekundärstruktur (siehe ΔG_{Dimer} -Werte) und damit die oben beschriebene Anwendung. Die Entwicklung des Sondensatzes TEM 224 beschreibt ein weiteres Anwendungsbeispiel für künstliche Fehlpaarungen beim Sondendesign, nämlich die Erweiterung des Spielraums bezüglich Sondenlänge und Schmelztemperatur. Der unmodifizierte Sondensatz (links) besteht bereits aus sehr kurzen Sonden (14 Nukleotide, definierte Untergrenze für das Sondendesign). Die G- und C-Sonden besitzen jedoch immer noch relativ hohe Schmelztemperaturen (57,4 °C, definierte Obergrenze für das Sondendesign). Eine weitere Verkürzung war nicht möglich, ohne die Spezifität der Oligonukleotide stark einzuschränken. Die Verringerung der Stabilität des Sonden-Ziel-DNA-Hybrids mit Hilfe eines Mismatches und die Kompensierung dieser Verringerung durch eine Sondenverlängerung ermöglichte eine Feinjustierung des Sondensatzes. Abbildung 3-24 b zeigt die Verbesserung des Diskriminierungsvermögens des Sondensatzes TEM 224.

Die Analyse der verschiedenen Sondensätze und die Auswahl der Sonden für die Erweiterung erfolgten auf der Basis der beschriebenen Testhybridisierungen. Folgende Eigenschaften wurden als optimal bewertet: (1) Eine ausreichende absolute Signalintensität der Perfect Match-Sonde ($I_{\text{PM}} > 2000$ Intensitätseinheiten) und (2) ein gutes Diskriminierungsvermögen mit Signalintensitäten der jeweiligen Mismatch-Sonden unter 40 % der jeweiligen Perfekt-Match-Sonde (RI_{MM} -Werte $< 0,4$). RI_{MM} -Werte zwischen 0,4 und 0,5 wurden als akzeptabel definiert. Bei verschiedenen Sondensätzen für die gleiche Position wurde der Sondensatz mit den besten Eigenschaften verwendet. Schmelztemperaturen und Sekundärstrukturen wurden an diesem Punkt nicht als Entscheidungskriterium herangezogen. Die thermodynamischen Parameter wurden jedoch mit dem Hybridisierungsverhalten der Sondensätze verglichen.

Für folgende Positionen wurde jeweils nur ein Sondensatz entwickelt: TEM 16, TEM 34, TEM 35, TEM 158, TEM 173, TEM 175, SHV 10, SHV 19, SHV 69, SHV 112, SHV 114 und SHV 148. Die absoluten Signalintensitäten der Perfect Match-Sonden dieser Sondensätze (I_{PM}) betragen im Durchschnitt mehr als 8900 IE. Die C-Sonde von SHV 112 zeigte mit ca. 2800 IE das niedrigste, jedoch ausreichende Signal. Keiner dieser Sondensätze wurde aufgrund zu niedriger Signalintensitäten ausgeschlossen. Alle Sondensätze zeigten sehr gute Diskriminierungsvermögen, da keine der Mismatch-Sonden Signalintensitäten größer als 37 % der jeweiligen Perfect Match-Sonde zeigten (G-Sonde TEM 173, $RI_{\text{MM}} < 0,37$). Die Sondensätze SHV 112.SM und SHV 114.SM zeigten erwartungsgemäß niedrige Signale deutlich unter 900 IE, da sie nicht perfekt komplementär zur hybridisierten SHV-1 Ziel-DNA waren. 13 dieser 14 Sondensätze zeigten zuvor thermodynamische Parameter innerhalb des erweiterten Bereichs. Lediglich die vier Sonden von SHV 148 zeigten ungünstige Haarnadel-Strukturen (jeweils -1.7 kcal/mol). Diese beeinträchtigten die Hybridisierung jedoch nicht entscheidend. Alle 14 Sondensätze konnten für die Erweiterung der Chipmodule verwendet werden.

Für die folgenden 10 Positionen wurden jeweils mehrere Sondensätze entwickelt: TEM 114, TEM 157, TEM 179, TEM 221, TEM 224, SHV 61, SHV 124, SHV 134, SHV 175 und SHV 269. Mit Ausnahme der SHV 61 Sondensätze zeigten alle Perfekt Match-Sonden der 27 Sondensätze größere Signalintensitäten als die C-Sonde von SHV 112 (ca. 2800 IE). Daher wurde keiner dieser Sondensätze aufgrund zu niedriger Signalintensitäten ausgeschlossen. Die C-Sonde von SHV 61.b zeigte mit ca. 1300 IE ein schwaches Signal. Die Vergleiche der verschiedenen Sondensätze für die einzelnen Positionen führten zu folgenden Ergebnissen:

(1) Der Sondensatz TEM 114.b zeigte im Vergleich zu TEM 114.a und 114.c das beste Diskriminierungsvermögen und gleichzeitig die höchsten Signalintensitäten. Diese Position ist von einer starken Haarnadel-Struktur betroffen. TEM 114.b und TEM 114.c besitzen eine künstliche Fehlpaarung, die die thermische Stabilität dieser Struktur verringert, die Ausbildung von Dimeren jedoch begünstigt. TEM 114.b ist dabei ein Nukleotid länger als TEM 114.c und lieferte daher höhere Signalintensitäten. Für die Erweiterung des TEM-Chipmoduls wurde TEM 114.b ausgewählt.

(2) Der Sondensatz TEM 157.a wurde für das TEM-Chipmodul ausgewählt, da es sich im Gegensatz zu TEM 157.b um einen mit vier Sonden vollständigen Sondensatz handelte. Er erfüllte die geforderten Eigenschaften bezüglich Signalintensität und Diskriminierung. Die um ein Nukleotid längeren Sonden des Reserve-Sondensatzes TEM 157.b zeigten erwartungsgemäß höhere Signalintensitäten.

(3) Die drei Sondensätze TEM 179.a, TEM 179.b und TEM 179.c zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. TEM 179.b zeigte das beste Diskriminierungsvermögen und wurde daher favorisiert. Dieser Sondensatz besitzt, wie auch die verkürzte Variante 179.c, eine künstliche Fehlpaarung, die die Stabilität einer Haarnadel-Struktur verringert.

(4) Die Sonden des Sondensatzes TEM 221.a waren von Dimer-Strukturen (-9,89 kcal/mol) betroffen. TEM 221.b besitzt im Gegensatz zu TEM 221.a ein künstliches Mismatch, das die Stabilität des Dimers verringert. Offensichtlich hatte diese Sekundärstruktur keine negativen Auswirkungen auf die Hybridisierung. TEM 221.a zeigte im Vergleich zu TEM 221.b das bessere Diskriminierungsvermögen und höhere Signalintensitäten. Für die Erweiterung des TEM-Chipmoduls wurde daher TEM 221.a ausgewählt.

(5) Der Sondensatz TEM 224 wurde bereits ausführlich besprochen (siehe Abbildung 3-24). Der Sondensatz TEM 224.a zeigte bereits ein ausreichendes Diskriminierungsvermögen, konnte durch das Einfügen einer künstlichen Fehlpaarung aber optimiert werden. Vorhandene Dimer-Strukturen (-9,89 kcal/mol) wurde nicht durch das Mismatch beeinflusst, wirkten sich aber wie schon bei TEM 221.a nicht entscheidend auf die Hybridisierung aus. Der im Vergleich zu TEM 224.a um ein Nukleotid längere Reserve-Sondensatz TEM 224.c zeigte zwar erwartungsgemäß höhere Signalintensitäten, aber eine schlechtere Diskriminierung. Der Sondensatz TEM 224.b wurde für das TEM-Chipmodul ausgewählt.

(6) Der Sondensatz SHV 61 wurde bereits besprochen (siehe Abbildung 3-24). Die Modifikation des Sondensatzes SHV 61.a ermöglichte erst die korrekte Identifizierung des untersuchten Nukleotids innerhalb der Ziel-DNA. Die im Vergleich längere Variante SHV 61.c zeigte zu niedrige Signale. SHV 61.b verfügte als einziger SHV 61-Sondensatz über die richtige Spezifität und wurde trotz schwacher Signalintensitäten (s. o.) und RI_{MM} -Werten von bis zu 0,55 für die Erweiterung des SHV-Chipmoduls ausgewählt.

(7) Der Sondensatz SHV 124.a wurde für die Chip-Erweiterung ausgewählt, da es sich im Gegensatz zu SHV 124.b um einen mit vier Sonden vollständigen Sondensatz handelte. Er erfüllte die geforderten Eigenschaften bezüglich Signalintensität und Diskriminierung. Die um ein Nukleotid kürzeren Sonden des Reserve-Sondensatzes SHV 124.b zeigten erwartungsgemäß niedrigere Signalintensitäten.

(8) Der Sondensatz SHV 134.a erfüllte trotz eines sehr stabiler Dimers der zu bla_{SHV-1} perfekt komplementären C-Sonde (-16,03 kcal/mol) die genannten Eigenschaften bezüglich Signalintensität und Diskriminierung und wurde für das SHV-Chipmodul ausgewählt. Bei SHV 134.a handelte es sich im Gegensatz zu SHV 134.b und SHV 134.c um einen mit vier Sonden vollständigen Sondensatz. Die mit künstlichen Mismatches versehenen Reserve-Sondensätze SHV 134.b und SHV 134.c besitzen ebenfalls ausgezeichnete Eigenschaften.

(9) Aus den vier Sondensätzen für die Position SHV 175 (.a - .d) wurden die Sondensätze SHV 175.b und SHV 175.c favorisiert. SHV 175.c zeigte die beste Diskriminierung, eine gute Signalintensität, aber eine Kreuzhybridisierung mit bla_{TEM} -Ziel-DNA (siehe Abbildung 3-20). SHV 175.b zeichnete sich durch eine gute Diskriminierung, eine niedrigere Signalintensität und keine Kreuzreaktivität aus. Alle Sondensätze bestanden aus 2 Sonden. Die Sondensätze SHV 175.c und SHV 175.d besitzen Fehlpaarungen, wobei das Mismatch bei SHV 175.c weiter vom Mutationsort entfernt liegt als bei SHV 175.d. Bei SHV 175.b handelte es sich um eine kürzere Version des konventionell entworfenen Sondensatzes SHV 175.a.

(10) Der Sondensatz 269.a zeigte eine bessere Diskriminierung als der Sondensatz 269.b. Auch bei diesem Sondensatz hatten die berechneten Dimere keine entscheidenden Auswirkungen auf die Hybridisierung. Daher wirkte sich die eingefügte Fehlpaarung nicht positiv aus. SHV 269.a wurde ausgewählt.

Für die 10 Polymorphismen wurden also 11 weitere Sondensätze ausgewählt. Für 4 Positionen wurden dabei Sondenvarianten mit künstlichen Fehlpaarungen favorisiert (TEM 114.b; TEM 179.b; TEM 224.b und SHV 61.b). Für weitere 6 Positionen wurden konventionelle Sondensätze zur Allel-spezifischen Hybridisierung bevorzugt. (TEM 157.a, TEM 221.a, SHV 124.a, SHV 134.a und SHV 269.a). Für SHV 175 wurden ein konventioneller (SHV 175.b) und ein modifizierter Sondensatz (SHV 175.c) ausgewählt.

Bei der Entwicklung von Sondensätzen zur gleichzeitigen Genotypisierung verschiedener Gene oder Gengruppen muss auch das Ausmaß von so genannten Kreuzhybridisierungen evaluiert werden. Als Kreuzhybridisierungen wurden in dieser Arbeit Fluoreszenzsignale bestimmter Sonden (z. B. TEM-spezifisch) bezeichnet, die diese nach Hybridisierung mit Ziel-DNA eines eigentlich nicht komplementären *bla*-Gens (z. B. SHV, CTX-M) zeigten. Diese zusätzlichen Fluoreszenzsignale können bei gleichzeitiger Hybridisierung der beiden relevanten *Targets* (z. B. TEM und SHV) das Diskriminierungsvermögen des Sondensatzes beeinflussen. Beim detektierten Signalmuster handelt es sich dann um zwei sich überlagernde Muster. Es kann jedoch nicht vorausgesagt werden, wie das Vorhandensein der komplementären Ziel-DNA die Hybridisierung zwischen Sonde und der potentiell kreuzhybridisierenden DNA beeinflusst bzw. in welchem Umfang diese dann überhaupt noch stattfinden kann. Zur Evaluierung wurden daher die Ergebnisse verschiedener Hybridisierungs-Szenarien analysiert.

Zur Abschätzung von Kreuzhybridisierungen der Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule wurden die Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung mit Ziel-DNA des jeweils anderen *bla*-Gens ausgewertet. Aufgrund des kombinierten Chip-Layouts und des Testhybridisierungskonzepts konnten hierzu die in Abbildung 3-20 a und c beschriebenen Hybridisierungsexperimente verwendet werden. Bereits in dieser Abbildung wurden Kreuzhybridisierungssignale der Sonden SHV 175.a, SHV 175.c und SHV 134.a hervorgehoben (Pfeil 1). Die quantifizierten Signale sind in Abbildung 3-25 dargestellt. Einzelne Sonden folgender Sondensätze zeigten relevante Kreuzhybridisierungen ($I > 500$): TEM 179.a, TEM 224.b, SHV 61.a, SHV 124.a, SHV 175.a und SHV 175.c. Drei dieser Sondensätze wurden für die Erweiterung der Chipmodule ausgewählt (TEM 224.b, SHV 124.a, und SHV 175.c).

Der Einfluss dieser Kreuzhybridisierungen auf die Leistungsfähigkeit der betreffenden Sondensätze konnte mit Hilfe der in Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22 dargestellten Signalintensitäten (I) und relativen Signalintensitäten (RI) der TEM- und SHV-spezifischen Sondensätze untersucht werden.

Die beiden TEM-Sondensätze zeigten jeweils eine Kreuzhybridisierung auf der C-Sonde von ca. 1000 - 1200 Intensitätseinheiten. In beiden Fällen handelte es sich um die Perfect Match-Sonde. Theoretisch können solche Kreuzhybridisierungen zu einem größeren Abstand des PM-Signals zu den entsprechenden MM-Signalen führen. Bei der Betrachtung der relativen Intensitäten konnte jedoch kein Effekt auf das Diskriminierungs-Verhalten dieser Sondensätze festgestellt werden. Der Effekt einer Kreuzhybridisierung auf die Leistungsfähigkeit eines Sondensatzes hängt nicht nur von deren Intensität ab, sondern natürlich auch von den absoluten Signalen der betroffenen Sonden bei Hybridisierung mit der eigentlich komplementären Ziel-DNA (in diesem Fall TEM). Diese lagen jeweils im Bereich von 10000 Intensitätseinheiten und damit etwa 10mal so hoch wie die Kreuzhybridisierung. Aufgrund des sehr niedrigen Signal-Niveaus des Sondensatzes SHV 61.a, dessen A-Sonde (Mismatch) eine Kreuzhybridisierung von ca. 800 Intensitätseinheiten zeigte, war ein Effekt sichtbar. Für das endgültige Chip-Layout wurde

Ergebnisse

diesem Sondensatz aber bereits der Sondensatz SHV 61.b vorgezogen. Die weitaus stärkeren Kreuzhybridisierungen (4000 bzw. 7800 Intensitätseinheiten) der G-Sonden (Perfect Match) der Sondensätze SHV 175.a und 175.c führten aufgrund des sehr hohen Signal-Niveaus dieser Sonden (ca. 28000 - 30000 Intensitätseinheiten) zu keiner Veränderung der Diskriminierung. Bei SHV 124.a konnte eine Verschlechterung der Diskriminierung festgestellt werden. Der RI_{MM} -Wert der C-Sonde, für welche ein Kreuzhybridisierungssignal von ca. 4800 Intensitätseinheiten detektiert wurde, stieg von 0,17 auf 0,42 an. Dieser Wert lag außerhalb des als optimal bezeichneten Bereichs (RI_{MM} -Wert < 0,4), jedoch in einem akzeptablen Bereich (RI_{MM} -Wert = 0,4 - 0,5).

Keine der detektierten Kreuzhybridisierungen fiel ergebnisverfälschend aus oder führte zu einer Einschränkung bezüglich der Wahl der Sondensätze für Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule. Kreuzhybridisierungen mit CTX-M-Ziel-DNA wurden an dieser Stelle nicht untersucht. Die abschließende Betrachtung des kompletten ESBL-Dreifach-Chips in Kapitel 3.1.5.7 enthält aber diese Fragestellung für alle Sondensätze des endgültigen Chip-Layouts.

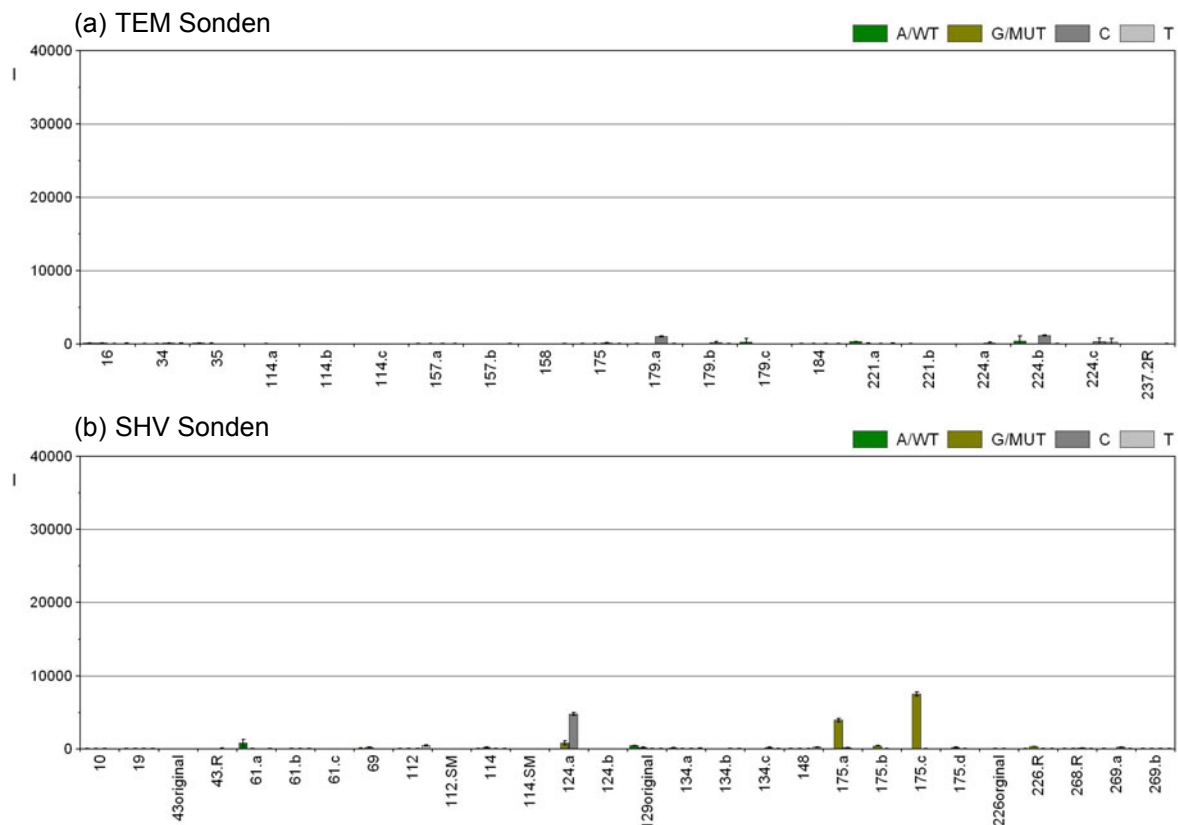


Abbildung 3-25: Kreuzhybridisierungssignale der Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule. Signalintensitäten (I) der TEM- bzw. SHV-spezifischen Sondensätze des Testchips (a bzw. b) nach Hybridisierung mit markierter Ziel-DNA der jeweils anderen β -Lactamase-Gruppe (a, SHV-1; b, TEM-3).

Fazit: Für die Genotypisierung von 22 Mutationen in bla_{TEM} und bla_{SHV} wurden 41 SONDENSÄTZE entworfen und getestet. Von diesen wurden letztendlich 25 für die Integration in die TEM- bzw. SHV-Chipmodule des Dreifach-Chips ausgewählt. Diese zeigten ein ausgezeichnetes Diskriminierungsvermögen bei Hybridisierungen unter optimierten Hybridisierungsbedingungen und geringe Kreuzhybridisierungen. Die Schmelztemperaturen der Sonden betragen 49,5 - 59,5 °C. Der T_M -Bereich dieser Sonden-Auswahl war um 2,8 °C kleiner als der T_M -Bereich aller entwickelten Sonden. Die durchschnittliche Schmelztemperatur betrug 53,8 °C. Nach Integration der Sonden wurde auf die Erweiterungen der Sondennamen (.a, .b, .c) verzichtet.

3.1.4.2. Sonden-Redesign I

Die Analyse der bereits vorhandenen TEM- und SHV-SONDENSÄTZE basierte auf Testhybridisierungen mit dem im vorangegangenen Kapitel 3.1.3 beschriebenen umgestalteten Dreifach-Chip. Die Hybridisierungen wurden mit jeweils 100 ng TEM-116-, SHV-1- und CTX-M-1-Ziel-DNA, welche entweder gleichzeitig oder einzeln hybridisiert wurden, unter optimierten Bedingungen (siehe 3.1.2) und mit Hilfe einer Hybridisierungsstation automatisiert durchgeführt. Folgende TEM- oder SHV-SONDENSÄTZE zeigten ein schwaches Diskriminierungsvermögen: TEM 184, TEM 237.2, SHV 226, und SHV 268.

Das Verhalten dieser SONDENSÄTZE bei gleichzeitiger Hybridisierung aller drei Ziel-Gene ist in Abbildung 3-26 dargestellt. Die G-Sonde des SONDENSÄTzes TEM 184 und die A-Sonde von TEM 237.2 zeigten Signalintensitäten von mehr als 60 % der jeweiligen Perfect Match-Sonde ($RI_{MM} > 0,6$; Pfeile 1 und 2). Sie zeigten damit die insgesamt schwächsten Diskriminierungskapazitäten. Die SHV-SONDENSÄTZE 226 und 268 konnten die entsprechenden Positionen der Ziel-DNA nicht korrekt identifizieren. Die G-Sonde von SHV 226 zeigte die größte Signalintensität (Pfeil 3). Die C-Sonde ist jedoch perfekt komplementär zu bla_{SHV-1} . Bei SHV 268 zeigte die G-Sonde anstatt der korrekten A-Sonde das größte Signal (Pfeil 4).

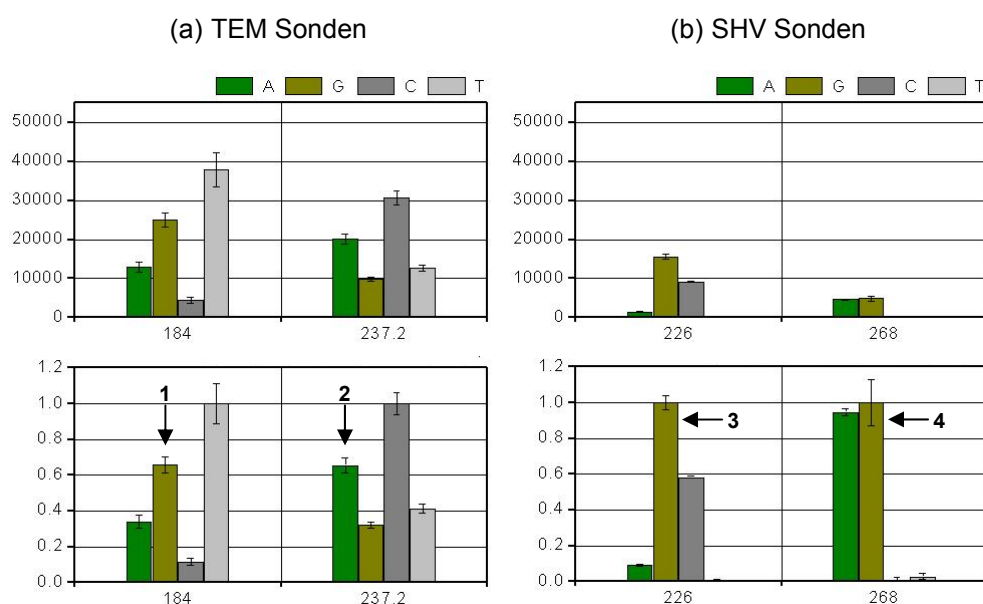


Abbildung 3-26: Leistungsfähigkeit einiger TEM- und SHV-SONDENSÄTZE des umgestalteten Dreifach-Chips nach gleichzeitiger Hybridisierung mit jeweils 100 ng TEM-116-, SHV-1- und CTX-M-1-Ziel-DNA. Hybridisierungsbedingungen: automatisierte Hybridisierung, 2x SSPE, 0,1 % SDS, 47 °C, 1h. PE-Scanner-PMT: 60 %. (1 - 4) Hybridisierungseigenschaften; ausführliche Erläuterung im Text.

Für die Sondensätze TEM 184 und TEM 237.2 wurde ein Redesign durchgeführt, mit dem Ziel einer besseren Diskriminierung. Die vorhandenen Sonden von SHV 226 und SHV 268 waren nicht geeignet für die gleichzeitige Genotypisierung verschiedener Ziel-DNA-Spezies unter Verwendung der aktuellen Hybridisierungsbedingungen und mussten ebenfalls überarbeitet werden. Beide SHV-Sondensätze wurden in einer vorausgegangenen Arbeit optimiert und mit jeweils einer künstlichen Fehlpaarung versehen (Grimm 2005). Dies traf auch für die Sondensätze SHV 43, SHV 129 und den komplexen Sondensatz SHV 238/240 zu. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der ursprünglichen SHV 43-, SHV 129- und SHV 226-Sonden ohne Fehlpaarungen, unter Verwendung der aktuellen Hybridisierungsbedingungen, wurden diese ebenfalls in das Testchip-Layout aufgenommen. Für den aus nur zwei Sonden bestehenden Sondensatz SHV 43 wurde zusätzlich ein Redesign durchgeführt. Der Sondensatz SHV 238/240 wurde separat optimiert.

Die Sondensequenzen und thermodynamischen Parameter folgender überarbeiteten (R) bzw. ursprünglichen Sondensätze (original) sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst: TEM 184_R, TEM 237.2_R, SHV 43_R, SHV 226_R, SHV 268_R, SHV 43_{original}, SHV 129_{original} und SHV 226_{original}. Aufgrund des integrierten Testchip-Layouts zur Aktualisierung der Chipmodule (siehe Abbildung 3-19), dienen die in 3.1.4.1 beschriebenen Testhybridisierungen mit TEM-3- und SHV-1-Ziel-DNA auch der Evaluierung der soeben beschriebenen Sondensätze. Die Signalintensitäten (I) und relative Signalintensitäten (RI) der Sondensätze nach gleichzeitiger bzw. einzelner Hybridisierung mit TEM-3- und SHV-1-Ziel-DNA sind daher in Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22 enthalten.

Tabelle 3-5: Sonden-Redesign

Sondenname ^a	Sondensequenz ^b (5'-3')	Länge ^c	T _M ^d (°C)	Haarnadel ΔG ^e (kcal/mol)	Dimer ΔG ^e (kcal/mol)
<i>bla</i> _{TEM} – spezifische Sonden					
TEM 184.R	CGATTCTG <u>GN</u> AGCAATGGCA	20	58.7	-1.45	-10.24
TEM 237.2R	ATCTGGAG <u>NC</u> GGTGAG	16	54.0	0.87	-9.75
<i>bla</i> _{SHV} – spezifische Sonden					
SHV 43 _{original} _{WT}	TGTCGGGC <u>CG</u> CGTAGG	16	61.1	-1.06	-10.61
SHV 43 _{original} _{MUT}	TGTCGGGC <u>AG</u> CGTAGG	16	57.8	-1.06	-3.61
SHV 43 _{WT}	GTCGGGC <u>CG</u> CGTAG	14	56.5	-1.06	-10.61
SHV 43 _{MUT}	GTCGGGC <u>AG</u> CGTAG	14	52.8	-1.06	-3.61
SHV 129 _{original}	CCGCCATTAC <u>NT</u> TAGCGATAACAG	25	55.0	-2.31	-6.75
SHV 226 _{original} _{WT}	CGTGCTG <u>CCG</u> GCGGG	15	64.4	-0.79	-16.03
SHV 226 _{original} _{MUT}	CGTGCTG <u>TC</u> GCGGG	15	60.4	-0.73	-3.61
SHV 226.R	CCGTGCTG <u>ACG</u> TCG	14	45.6	-1.48	-9.45
	CCGTGCTG <u>GCG</u> TCG	14	50.6	-0.55	-3.61
	CCGTGCTG <u>CCG</u> TCG	14	50.6	0.16	-3.61
	CCGTGCTG <u>TCG</u> TCG	14	45.6	-0.27	-3.61
SHV 268.R	CTGCG <u>T</u> GAT <u>NCC</u> CCGG	16	48.2	0.15	-9.75

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: WT, Wildtyp; MUT, Mutante; original, ursprünglicher Sondenentwurf; R, Redesign.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Relevante Mutationen (fett) bzw. zusätzliche Mismatches (blau) sind hervorgehoben und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer berechnet. Für Sonden mit zusätzlichen künstlichen Mismatches wurde die T_M-Mismatch berechnet.

^e Die Stabilität von Sekundärstrukturen (Haarnadel und Dimer) wird als Wert der freien Energie ΔG angegeben und wurde ebenfalls mit OligoAnalyzer berechnet.

Die absoluten Signalintensitäten der jeweiligen Perfect Match-Sonden lagen alle über 2400 IE. Damit wurde keiner der hier betrachteten TEM- oder SHV-Sondensätze sofort aufgrund zu niedriger Signalintensitäten ausgeschlossen. Im Folgenden werden daher vor allem die relativen Signalintensitäten genauer erläutert. (I) TEM-Sondensätze: Beim Redesign von TEM 184 wurde eine künstliche Fehlpaarung eingeführt und die Sonden um ein Nukleotid verlängert. Obwohl das künstlich eingeführte Mismatch die theoretische Ausbildung eines starken Dimers (-10,4 kcal/mol) der C-Sonde nicht verhindern konnte, führte dies zu einer deutlichen Verbesserung der Diskriminierung mit RI-Werten aller Mismatch-Sonden unter 0,1. Für TEM 237.2 wurde die um ein Nukleotid kürzere Variante TEM 235.2R entworfen. Zwar konnte dies das hohe Signal der A-Sonde von über 60 % auf 38 % des Perfect Match- Signals verringern, jedoch zeigte die G-Sonde einen Wert von 62 %. Beide Sondensätze sind daher gleichwertig. (II) SHV-Sondensätze: Die ursprünglichen SHV-Sondensätze SHV 43_{original} und SHV 226_{original} konnten die entsprechenden Positionen der Ziel-DNA nicht korrekt identifizieren. Da auch SHV 129_{original} ein schwächeres Diskriminierungsvermögen (RI_{MM}-Wert der G-Sonde = 0,32) im Vergleich zur aktuellen Sondensatz-Version zeigte (RI_{MM}-Wert der G-Sonde = 0,23), wurden diese Varianten nicht weiter berücksichtigt. Beim überarbeiteten Sondensatz SHV 43R handelte es sich um eine um zwei Nukleotide verkürzte Version von SHV 43_{original}. Er identifizierte die entsprechende Position der Ziel-DNA korrekt und zeigte eine perfekte Diskriminierung. SHV 43R wurde allerdings nicht in das Layout integriert, bleibt jedoch als Alternative verfügbar. Das Redesign der Sondensätze SHV 226 und SHV 268 führte zur korrekten Identifikation der entsprechenden Positionen der Ziel-DNA. Dabei lag keiner der RI_{MM}-Werte dieser Sondensätze über 0,33. Bei beiden Sondensätzen wurde am Konzept der künstlichen Fehlpaarungen festgehalten. Bei SHV 226 wurde die Position des Mismatches um ein Nukleotid von der Position des Mutationsortes entfernt und die Sonden um jeweils ein Nukleotid verkürzt. Die Sonden von SHV 268 wurden um ein Nukleotid verlängert. Außerdem wurde die Position dieses Sondensatzes um vier Nukleotide verändert.

Fazit: Die Sondensätze TEM 184R, TEM 237.2R, SHV 226R, und SHV 268R wurden für die Integration ausgewählt. Da die Sondensätze TEM 184, TEM 237.2, SHV 226 und SHV 268 jedoch aus drucktechnischen Gründen nicht aus dem Layout entfernt wurden, konnte die abschließende Wahl zwischen den beiden TEM 237.2 Sondensätzen nach der Validierung des erweiterten Dreifach-Chips, und damit auf einer breiteren Datenbasis getroffen werden. Im Gegensatz zu den Sonden zur Erweiterung der Chipmodule wurden nach der Integration der überarbeiteten Sonden die Erweiterungen der Sondennamen (.R) beibehalten.

3.1.4.3. Sonden-Redesign II

Der Sondensatz SHV 238/240 detektiert Mutationen, die ursächlich für die Aminosäure-Austausche Gly238Ser und Glu240Lys sind. Aufgrund der direkten Assoziation dieser Substitutionen mit einem erweiterten Substratspektrum, sollte speziell dieser Sondensatz ein Optimum an Spezifität aufweisen. Aufgrund der komplexen Situation von drei potentiellen Mutationen in einem Bereich von 6 Nukleotiden, musste beim Entwurf der SHV 238/240-Sonden das allgemeine Sondenkonzept zur SNP Detektion aufgebrochen werden.

Verena Grimm entwickelte in einer vorangegangenen Arbeit (Grimm 2005) einen Sondensatz, der aus neun verschiedenen Sonden besteht, die jeweils komplementär für eine der möglichen Sequenzvarianten sind. Das Standarddesign, das eine einheitlichen Länge und Position der einzelnen Sondenvarianten vorsieht (SHV 238/240_{original}), lieferte nicht in allen Fällen ein korrektes bzw. ausreichend spezifisches Ergebnis. Die Identifizierung von *bla*_{SHV-2} (PM = SEg) wurde durch ein hohes Signal der GEG-Sonde (RI_{MM} > 90 %) erschwert. Dieses Verhalten wurde auf ein starkes Dimer der SE-Sonden im Vergleich zu den GE-Sonden (siehe Tabelle 3-7) zurückgeführt. Die Identifizierung von *bla*_{SHV-4} (PM = SKg) war aufgrund deutlich höherer GEG-, SEg- und SKa-Signale nicht möglich. In einem ersten Redesign wurden die Sonden mit einem künstlichen Mismatch ausgestattet (siehe Tabelle 3-7, SHV 238/240_{Mismatch}). Diese Maßnahme verhinderte zwar die Ausbildung des Dimers

und verbesserte das Diskriminierungsvermögen des Sondensatzes, verringerte aber die Signalintensitäten der SE- und SK-Sonden drastisch auf unter 1000 Intensitätseinheiten. Diese Verringerung kann vor allem durch die stark verringerten Schmelztemperaturen erklärt werden (siehe Tabelle 3-7, T_M -Misatch). Das Layout des umgestalteten Dreifach-Chips (siehe 3.1.3, Abbildung 3-16) enthält diesen Sondensatz.

Im Hinblick auf die parallele Hybridisierung der SHV-Ziel-DNA mit Ziel-DNA weiterer β -Lactamasegene und der in Kapitel 3.1.2 durchgeführten Optimierungen der Hybridisierungsbedingungen hin zu stringenteren Bedingungen, sind solch niedrige Signalintensitäten jedoch kritisch. Testhybridisierungen zeigten, dass bereits schwache Kreuzhybridisierungen der GE-Sonden bei gleichzeitiger Hybridisierung von bla_{SHV-12} (PM = SKg) mit bla_{TEM-1} eine korrekte Identifizierung des bla_{SHV} -Gens verhinderten. Auf der Basis des Sondensatzes SHV 238/240_{original} (ohne künstliches Mismatch) wurde in dieser Arbeit ein weiteres Redesign von SHV 238/240 durchgeführt. Die neun Sondenvarianten mussten dabei keine einheitlichen Position und Länge besitzen. Diese Änderungen waren nötig, da sich die Austausch an verschiedenen Positionen innerhalb der Sondensequenz unterschiedlich auf die Hybridisierungseigenschaften der Sonden auswirken. So scheint der Sondensatz durchaus Diskriminierungspotential bezüglich der beiden Positionen innerhalb des Triplets für Aminosäure 240 zu haben, weniger dagegen bezüglich der Mutation in 238. Da bis zu drei G zu A Austausch gleichzeitig detektiert werden mussten (GEg vs. SKa), war der Schmelztemperatur-Bereich des Sondensatzes grundsätzlich sehr breit. Mit Hilfe unterschiedlicher Sondenlängen sollten einheitlichere Schmelztemperaturen und damit Hybridisierungseffektivitäten erreicht werden.

Tabelle 3-6: Redesign der Sonden des Sondensatzes SHV 238/240

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T_M ^d	Layout ^e
SHV 238/240 _{GEa}	GGAGCT <u>GGCGAA</u> CGGG	16	59.6	1
SHV 238/240 _{GEa R}	GGAGCT <u>GGCGAA</u> CGG	15	56.7	2, 3
SHV 238/240 _{GEg}	GGAGCT <u>GGCGAG</u> CGGG	16	62.6	1
SHV 238/240 _{GEg R}	GGAGCT <u>GGCGAG</u> CG	14	57	2, 3
SHV 238/240 _{SEa}	GGAGCT <u>AGCGAA</u> CGGG	16	55.7	1, 2
SHV 238/240 _{SEa R}	CGGAGCT <u>AGCGAA</u> CGGG	17	58.6	3
SHV 238/240 _{SEg}	GGAGCT <u>AGCGAG</u> CGGG	16	58.7	1
SHV 238/240 _{SEg R}	GGAGCT <u>AGCGAG</u> CGG	15	55.8	2
SHV 238/240 _{SEg R2}	CGGAGCT <u>AGCGAG</u> CGG	16	58.8	3
SHV 238/240 _{SKa}	GGAGCT <u>AGCAA</u> CGGG	16	53.1	1, 2
SHV 238/240 _{SKa R}	CGGAGCT <u>AGCAA</u> CGGG	17	56.2	3
SHV 238/240 _{SKg}	GGAGCT <u>AGCAAG</u> CGGG	16	56.1	1
SHV 238/240 _{SKg R}	CGGAGCT <u>AGCAAG</u> CGG	16	56.3	2
SHV 238/240 _{SKg R2}	CCGGAGCT <u>AGCAAG</u> CGG	17	59	3
SHV 238/240 _{AEa}	GGAGCT <u>GCCGAA</u> CGGG	16	59.6	1
SHV 238/240 _{AEa R}	GGAGCT <u>GCCGAA</u> CGG	15	56.7	2, 3
SHV 238/240 _{AEg}	GGAGCT <u>GCCGAG</u> CGGG	16	62.6	1
SHV 238/240 _{AEg R}	GGAGCT <u>GCCGAG</u> CG	14	57	2, 3
SHV 238/240 _{AK}	GGAGCT <u>GCCAAA</u> CGGG	16	57	1
SHV 238/240 _{AK R}	GGAGCT <u>GCCAAA</u> CGG	15	54	2, 3

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: R bzw. R2, erste bzw. zweite Variante des Redesigns.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Relevante Mutationen sind hervorgehoben und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer berechnet und in °C angegeben.

^e Layout-Bezeichnung in

Tabelle 3-6 fasst die Originalsonden (ohne Erweiterung des Sondennamens) und verschiedene neu entwickelte Varianten der einzelnen Sonden zusammen (R bzw R2). Die Sonden bzw. Sondenpaare wurden individuell verändert. Während z. B. die GE-, AE- und AK-Sonden gekürzt wurden, wurden die SE-Sonden verlängert oder wie die SK-Sonden in ihrer Position verändert. Zur Ermittlung der besten Kombination aus Originalsonden und neu entwickelten Sonden wurden drei Layout-Varianten mit unterschiedlichen Sondenkombinationen entworfen. Bei Layout 1 handelte es sich um das Original-Layout, also um SHV 238/240_{original}. In Layout 2 wurden, mit Ausnahme der Sonden SEa und SKa, alle Sonden durch eine neue Variante ersetzt (R). In Layout 3 wurden nur neue entwickelte Sonden verwendet. Für die Sonden SEg und SKg wurden jedoch andere Varianten als in Layout 2 eingesetzt (R2). Die drei Layout-Varianten bildeten das Gesamtlayout eines Test-Microarrays (siehe Abbildung 3-27).

Die mittels PCR amplifizierten *bla*_{SHV}-Gene der klinischen Isolate zur Validierung des ESBL-Chips (siehe 3.1.5) wurden zeitlich parallel zu den letzten Microarray-Optimierungen sequenziert. Zusätzlich zu den SHV-Referenzstämmen (siehe 2.1.7.1), standen daher Sequenzinformationen für weitere *bla*_{SHV}-Gene zur Verfügung. Für Testhybridisierungen wurden folgende relevanten *bla*_{SHV}-Gene verwendet: zwei unterschiedliche SHV-1-Varianten (PM = GEa bzw. PM = GEg), SHV-2 (PM = SEg) und SHV-5 (PM = SKg). Nach der Prozessierung der Ziel-DNA (siehe 2.2.6) wurden die verschiedenen markierten PCR-Produkte unter identischen Bedingungen automatisiert hybridisiert (siehe 2.2.7). Die Testung wurde unter denselben Bedingungen wie die spätere Validierung durchgeführt. Es wurden daher die optimierten Hybridisierungsbedingungen (siehe 3.1.2) verwendet (2x SSPE, 0,1 % SDS, 47 °C, 1 h). Standardmäßig wurden jeweils 100 ng Ziel-DNA eingesetzt. In Abbildung 3-27 a (Iso-16) wurden jedoch 150 ng Ziel-DNA (TEM/SHV Dualplex-PCR-Produkt) eingesetzt, da es sich um eine Mischung aus SHV-1- und TEM-1-Ziel-DNA handelte. Mit Hilfe dieser Mischung konnte der potentielle Einfluss von *bla*_{TEM}-DNA auf die Sonde GEg betrachtet werden. Die Einbauraten lagen zwischen 52 und 72 NT/Cy-3.

Die Abbildung 3-27 zeigt das Layout, die Fluoreszenzbilder und die Auswertung der Signale des Testchips nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der verschiedenen *bla*_{SHV}-Allele. Im Folgenden werden die wichtigsten Hybridisierungseigenschaften erläutert, welche für die Auswahl der Sonden für einen neuen SONDENSATZ SHV 238/240_{Redesign} entscheidend waren. Diese sind in der Abbildung 3-27 mit den Ziffern 1 - 4 hervorgehoben.

(1) GE-Sonden: Die im Verhältnis zu den ursprünglichen Sonden (Layout 1) um ein bzw. zwei Nukleotide gekürzten Sonden GEa R und GEg R (siehe Tabelle 3-6; Layout 2 und 3) zeigten eine deutlich bessere Diskriminierung bei Hybridisierungen mit der jeweils komplementären SHV-1 Ziel-DNA (GEa bzw. GEg). Die neue Sonde GEg R zeigte zusätzlich deutlich niedrigere Signale bei der Hybridisierung mit nicht perfekt komplementärer SHV-2-(SEg) oder SHV-5-Ziel-DNA (SKg), welche sich in ein bzw. zwei Nukleotiden von der Sondensequenz unterscheiden. Eine Kreuzhybridisierung mit TEM-1, welche für das hohe GEg-Signal in Abbildung 3-27 a mitverantwortlich sein könnte, konnte für die neu entwickelten Sonden ebenfalls ausgeschlossen werden.

(2) AE-Sonden: Ähnlich wie bei den GE-Sonden wurden auch bei den AE-Sonden verkürzte Varianten getestet (ein bzw. zwei Nukleotide, siehe Tabelle 3-6). Die Sonden AEa R und AEg R (Layout 2 und 3) zeigten deutlich niedrigere Signale bei der Hybridisierung mit nicht perfekt komplementärer SHV-1- (GEa/GEg) und SHV-2-Ziel-DNA (SEg) und damit eine deutlich niedrigere Kreuzreaktivität als die ursprünglichen Sonden (Layout 1).

(3) SE-Sonden: Nur mit Hilfe der Sondenkombination in Layout 3 (SEa R und SEg R2) war es möglich, die hybridisierte SHV-2-Ziel-DNA korrekt zu identifizieren. Die ursprüngliche SEa-Sonde wurde um ein Nukleotid verlängert, die Position der SEg-Sonde um ein Nukleotid verschoben (siehe Tabelle 3-6). Für die korrekte Identifizierung ist neben einer guten Diskriminierung zwischen SEa und SEg vor allem eine Unterscheidung zwischen SEg und

GEg essentiell, da auch hier der Sequenzunterschied nur ein einzelnes Nukleotid betrifft. Die Unterscheidung zwischen SEg R2 und GEg R war korrekt. In Layout 3 zeigte GEg einen RI_{MM} -Wert von 0,69.

(4) SK-Sonden: Die Kombination der ursprünglichen Sonde SKa und der neuen Sonde SKg R (Layout 2) zeigte eine gute Diskriminierung bei Hybridisierung mit SHV-5-Ziel-DNA (SKg) einerseits, und niedrige Signale bei Hybridisierung mit SHV-2-Ziel-DNA (SEg) andererseits. Die Position der ursprünglichen SKg-Sonde wurde um ein Nukleotid verschoben. Diese Kombination wurde gegenüber der ursprünglichen Kombination, welche ein ähnliches Diskriminierungsvermögen besaß, aufgrund des adäquateren Signalintensitäts-Niveaus bevorzugt.

Eine Variante der AK-Sonde konnte nicht aufgrund der Hybridisierungen ausgewählt werden. Aufgrund der niedrigeren Schmelztemperatur, wurde für den Sondensatz SHV 238/240_{Redesign} die um ein Nukleotid gekürzte Sonde AK R ausgewählt. Tabelle 3-7 fasst die endgültige Auswahl der Sonden für den Sondensatz SHV 238/240_{Redesign} zusammen und vergleicht diesen mit den Versionen SHV 238/240_{original} und SHV 238/240_{Mismatch} hinsichtlich thermodynamischer Parameter wie Schmelztemperatur und Sekundärstrukturen.

Der überarbeitete Sondensatz zeichnete sich durch einen deutlich engeren Schmelztemperaturbereich aus. Die Schmelztemperaturen variierten nur in einem Bereich von 5,7 °C. Die mittlere Schmelztemperatur lag um 1,8 °C unterhalb der des Original-Sondensatzes, jedoch deutlich (4,4 °C) über der des Mismatch-Sondensatzes. Diese Verringerung basierte vor allem auf der Kürzung der GE-, AE-, AK-Sonden, und sollte zu einer erhöhten Spezifität der Hybridisierung führen. Die durch starke Dimere und Haarnadel-Strukturen beeinflussten SE- und SK-Sonden wurden dagegen nicht gekürzt bzw. sogar verlängert. Die Sekundärstrukturen wurden durch das Redesign nicht beeinflusst.

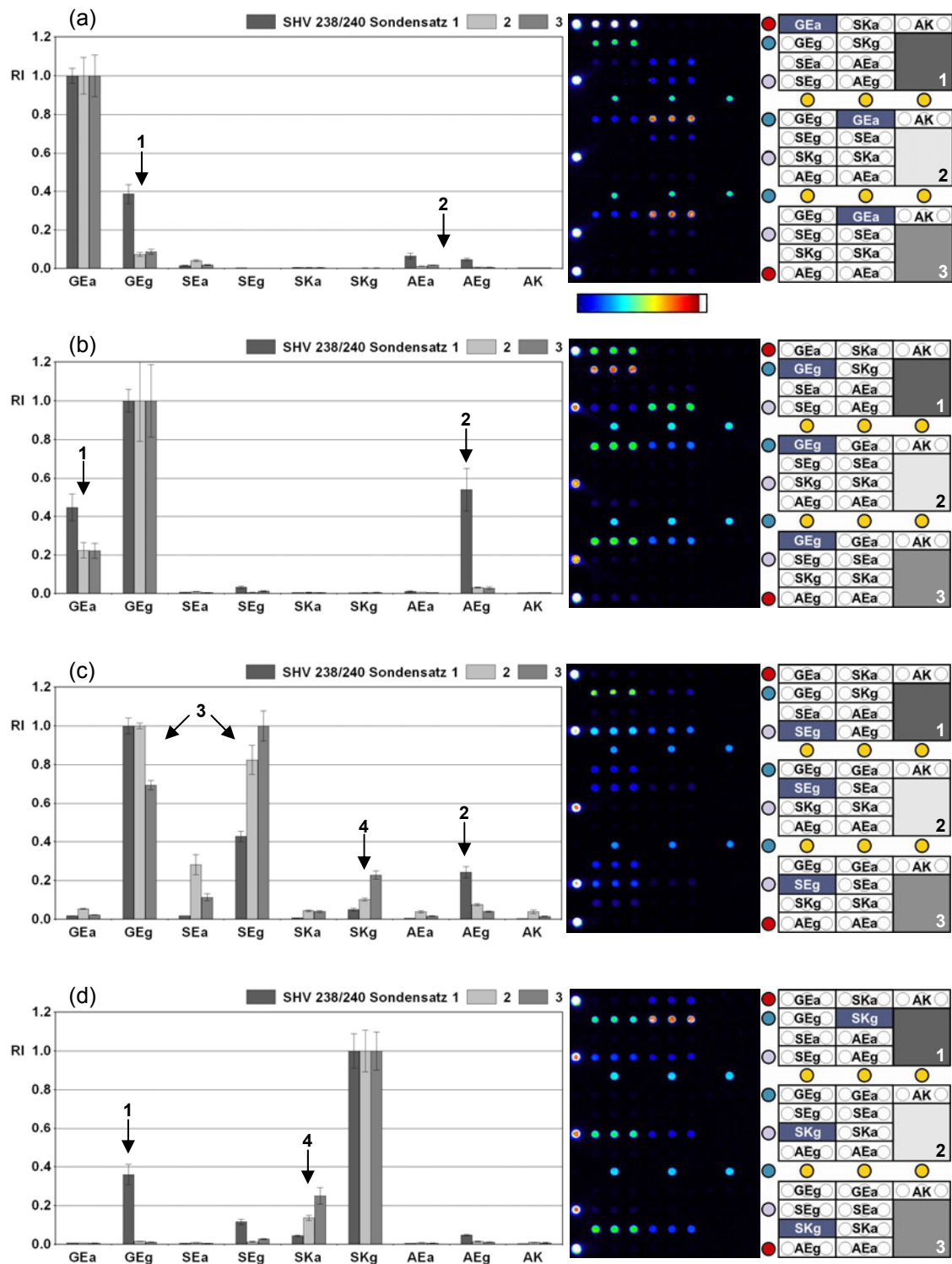


Abbildung 3-27: Redesign des Sondensatzes SHV 238/240. Ergebnisse der Testhybridisierungen mit markierter SHV-1 (a) (PM = GEa, Iso-16, 150ng, Einbaurate: 64 NT/Cy3), SHV-1 (b) (PM = GEg, Iso-62, 100ng, 58 NT/Cy3), SHV-2 (c) (PM = SEg, SHV-2-Referenz, 100ng, 72 NT/Cy3) und SHV-5 (d) (PM = SKg, Iso-5, 100ng, 52 NT/Cy3) Ziel-DNA. Für alle Fluoreszenzbilder: PE-Scanner-PMT: 60 %. Für alle Layouts: Theoretische Perfect Matches sind dunkelblau hervorgehoben; Farbskala der Kontrollen entspricht der Farbskala in Abbildung 3-19. (1 - 4) Hybridisierungseigenschaften, die zur Auswahl bestimmter Sondenvarianten beigetragen haben; ausführliche Erläuterung im Text.

Tabelle 3-7: Verschiedene Varianten des Sondensatzes SHV 238/240

Bezeichnung	Sondenname ^a	Sondensequenz ^b (5'-3')	Länge ^c	T _M ^d [°C]	Haarnadel ΔG ^e [kcal/mol]	Dimer ΔG ^e [kcal/mol]
SHV 238/240 _{original}	SHV 238/240 _{GEa}	GGAGCT <u>GGCGAA</u> CGGG	16	59.6	0.54	-6,34
	SHV 238/240 _{GEg}	GGAGCT <u>GGCGAG</u> CGGG	16	62.6	-1.02	-6,34
	SHV 238/240 _{SEa}	GGAGCT <u>AGCGAA</u> CGGG	16	55.7	1.9	-10.44
	SHV 238/240 _{SEg}	GGAGCT <u>AGCGAG</u> CGGG	16	58.7	-1.15	-10.44
	SHV 238/240 _{SKa}	GGAGCT <u>AGCAA</u> CGGG	16	53.1	1.9	-10.44
	SHV 238/240 _{SKg}	GGAGCT <u>AGCAAG</u> CGGG	16	56.1	-1.26	-10.44
	SHV 238/240 _{AEa}	GGAGCT <u>GCCGAA</u> CGGG	16	59.6	-0.76	-6.68
	SHV 238/240 _{AEg}	GGAGCT <u>GCCGAG</u> CGGG	16	62.6	-1.02	-6.68
	SHV 238/240 _{AK}	GGAGCT <u>GCCAAA</u> CGGG	16	57	-0.33	-6,34
Mittelwert				58.3		
				Δ	9.5	
SHV 238/240 _{Mismatch}	SHV 238/240 _{GEa}	GGAGCT <u>GGTGA</u> CGGG	16	53.4	0.54	-6,34
	SHV 238/240 _{GEg}	GGAGCT <u>GGTGAG</u> CGGG	16	56.6	-1.02	-6,34
	SHV 238/240 _{SEa}	GGAGCT <u>AGTGA</u> CGGG	16	49.1	1.9	-6,34
	SHV 238/240 _{SEg}	GGAGCT <u>AGTGAG</u> CGGG	16	52.4	-1.15	-6,34
	SHV 238/240 _{SKa}	GGAGCT <u>AGTAA</u> CGGG	16	46.1	1.9	-6,34
	SHV 238/240 _{SKg}	GGAGCT <u>AGTAAG</u> CGGG	16	49.4	-1.26	-6,34
	SHV 238/240 _{AEa}	GGAGCT <u>GCTGA</u> CGGG	16	53.7	0.59	-6,34
	SHV 238/240 _{AEg}	GGAGCT <u>GCTGAG</u> CGGG	16	57.0	-1.02	-6,34
	SHV 238/240 _{AK}	GGAGCT <u>GCTAA</u> CGGG	16	50.8	0.59	-6,34
Mittelwert				52.1		
				Δ	10.5	
SHV 238/240 _{Redesign}	SHV 238/240 _{GEa R}	GGAGCT <u>GGCGAA</u> CGG	15	56.7	0.95	-6,34
	SHV 238/240 _{GEg R}	GGAGCT <u>GGCGAG</u> CG	14	57	-1.02	-6,34
	SHV 238/240 _{SEa R}	CGGAGCT <u>AGCGAA</u> CGGG	17	58.6	-0.01	-10.44
	SHV 238/240 _{SEg R2}	CGGAGCT <u>AGCGAG</u> CGG	16	58.8	-1.15	-10.44
	SHV 238/240 _{SKa}	GGAGCT <u>AGCAA</u> CGGG	16	53.1	1.9	-10.44
	SHV 238/240 _{SKg R}	CGGAGCT <u>AGCAAG</u> CGG	16	56.3	-1.26	-10.44
	SHV 238/240 _{AEa R}	GGAGCT <u>GCCGAA</u> CGG	15	56.7	-0.35	-6.68
	SHV 238/240 _{AEg R}	GGAGCT <u>GCCGAG</u> CG	14	57	-1.02	-6,34
	SHV 238/240 _{AK R}	GGAGCT <u>GCCAAA</u> CGG	15	54	-0.33	-6,34
Mittelwert				56.5		
				Δ	5.7	

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: R bzw. R2, erste bzw. zweite Variante des Redesigns.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Relevante Mutationen (fett) bzw. zusätzliche Mismatches (blau) sind hervorgehoben und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer berechnet. Für Sonden mit zusätzlichen Mismatches (mittlerer Sondensatz) wurde die T_M-Mismatch berechnet.

^e Die Stabilität von Sekundärstrukturen (Haarnadel und Dimer) wird als Wert der freien Energie ΔG angegeben und wurde ebenfalls mit OligoAnalyzer berechnet.

Für die abschließende Betrachtung des überarbeiteten Sondensatzes zeigt Abbildung 3-28 die Auswertung der in Abbildung 3-27 gezeigten Testhybridisierungen, jedoch nur unter Berücksichtigung der letztendlich für den Sondensatz SHV 238/240_{Redesign} ausgewählten Sondenvarianten.

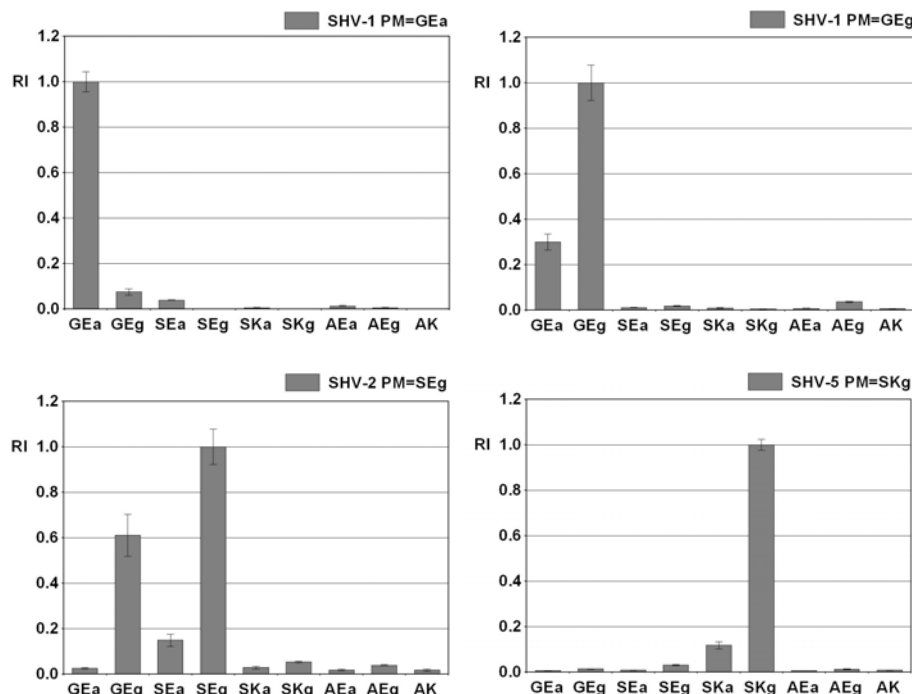


Abbildung 3-28: Leistungsfähigkeit des Sondensatzes SHV 238/240_{Redesign}. Auswertungen der Testhybridisierungen mit (a) SHV-1 (PM = GEa), (b) SHV-1 (PM = GEg), (c) SHV-2 (PM = SEg) und (d) SHV-5 (PM = SKg). Für die Berechnung der relativen Intensitäten (RI) und deren Standardabweichungen wurden alle technischen Replikate der Sondenvarianten auf dem Testchip berücksichtigt.

Fazit: Der Sondensatz SHV 238/240_{Redesign} identifizierte die verschiedenen *bla*_{SHV}-Allele korrekt. Nach dem Redesign stand somit wieder ein Sondensatz für die wichtigen Positionen 238 und 240 zur Verfügung, der unter den geänderten Hybridisierungsbedingungen voll funktionsfähig ist. Aufgrund der höheren Spezifität im Vergleich zu SHV 238/240_{original} und den höheren Signalintensitäten im Vergleich zu SHV 238/240_{Mismatch} sollte dieser zusätzlich robust gegenüber Kreuzhybridisierungen anderer β -Lactamasegene sein. Auch der Sondensatz SHV 238/240_{Mismatch} wurde aus technischen Gründen nicht aus dem Layout entfernt. Er wurde aber nicht für die Identifizierung verwendet.

3.1.5 Validierung mit klinischen Isolaten

Für die Validierung des aktualisierten Dreifach-Chips zur gleichzeitigen Genotypisierung von TEM-, SHV- und CTX-M- β -Lactamasen sollten die verschiedenen Aspekte der Assay-Etablierung, Optimierung, Erweiterung des Sondendesigns und Redesigns, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden, einfließen. Für die Validierung standen 60 klinische Isolate, welche in der täglichen Routine am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart (Abteilung für Labormedizin) und am Universitätsklinikum der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main (Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene) gesammelt wurden, zur Verfügung. Mit Hilfe von Standard-Labormethoden zur Antibiotika-

Empfindlichkeitstestung (z. B. Agardiffusionstests) gemäß CLSI-Richtlinien und der halbautomatischen Bestimmung (VITEK 2XL System) der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) wurden 58 Isolate phänotypisch als „ESBL positiv“ identifiziert. Zwei Isolate zeigten einen „ESBL negativen“ bzw. einen nicht eindeutigen Phänotyp (Iso-23 und Iso-62). Kapitel 6.4 bietet einen vollständigen Überblick über die phänotypischen Daten aller Isolate. Tabelle 3-8 beinhaltet unter anderem die MHK-Werte für Cefotaxim (CTX) und Ceftazidim (CAZ). Es handelte sich hauptsächlich um *E. coli*-Isolate oder Isolate diverser *Klebsiella* Spezies (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca* oder *K. terrigena*), und um jeweils ein *E. sakazakii*-, *E. intermedius*-, *P. vulgaris*-, *C. freundii*- und *R. aquatilis*-Isolat. Die DNA-Isolierung wurde am Robert-Bosch-Krankenhaus durchgeführt. Verblindete Proben isolierter Plasmid-DNA stellten somit den Ausgangspunkt für die folgenden Versuche dar.

3.1.5.1. Herstellung der Ziel-DNA/PCR Screening

Zur Herstellung der markierten Ziel-DNA für die Microarray-Hybridisierung und zur Produktion nicht markierter DNA für die Sequenzierung der detektierten *bla*-Gene, wurden die in Kapitel 3.1.1 ausführlich erläuterten PCR-Methoden eingesetzt. Da die PCR-Ergebnisse immer mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurden, entsprach dieser Teil des Assays einem vollständigen Screening der klinischen Proben auf das Vorhandensein von *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}. Die Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30 zeigen beispielhaft die Ergebnisse des Screenings mit Hilfe der etablierten TEM/SHV Dualplex-PCR. Während Abbildung 3-29 die Ergebnisse einer als Standard-PCR durchgeführten Amplifikation beschreibt, zeigt Abbildung 3-30 die Ergebnisse einer Markierungs-PCR. Die Herstellung der CTX-M-Ziel-DNA in zwei Schritten ist ebenfalls beispielhaft in Abbildung 3-31 und Abbildung 3-32 dargestellt. Da hierfür zunächst eine Multiplex-PCR mit unterschiedlichen Primern für die verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Gruppen eingesetzt wurde (Abbildung 3-31), standen für die detektierten *bla*_{CTX-M}-Gene zusätzlich Informationen bezüglich ihrer Gruppenzugehörigkeit zur Verfügung. Abbildung 3-32 zeigt die anschließende Markierungs-PCR mit Gruppen-spezifischen CTX-M-Primerpaaren.

Bei 63,3 % aller Isolate konnte ein *bla*_{TEM}-Gen nachgewiesen werden (38 positive Isolate/60 getestete Isolate), bei 38,3 % ein *bla*_{SHV}-Gen (23/60) und bei 70 % ein *bla*_{CTX-M}-Gen (42/60). Zwei Isolate (3,3 %) waren weder positiv für *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} oder *bla*_{CTX-M}. Während 55,2 % aller getesteten *E. coli*-Isolate ein *bla*_{TEM}-Gen besaßen (16/29), war nur ein Isolat positiv für *bla*_{SHV} (3,4 %) und nicht weniger als 93,7 % positiv für *bla*_{CTX-M} (27/29). Die verschiedenen *Klebsiella*-Spezies waren positiv für *bla*_{TEM} in 69,2 % (16/26), für *bla*_{SHV} in 80,7 % (21/26) und für *bla*_{CTX-M} in 57,7 % (15/26). Bei 81 % der *bla*_{CTX-M}-positiven Isolate (34/42) wurde ein für die Gruppe M1 spezifisches PCR-Produkt detektiert. Nur 6 Isolate (14,3 %) waren positiv für ein *bla*_{CTX-M}-Gen der Gruppe M9. Zwei Isolate (4,8 %) besaßen sowohl ein *bla*_{CTX-M}-Gen der Gruppe M1 als auch M9.

Alle detektierten *bla*-Gene wurden sequenziert. Hierfür wurde mit den aufgereinigten, aus getrennten Amplifikationen erhaltenen, nicht markierten PCR-Produkten gemäß den Richtlinien des Sequenzier-Dienstleisters GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) verfahren (siehe auch 2.2.10).

Nach Aufreinigung der markierten Ziel-DNA für die Microarray-Hybridisierung wurde neben der DNA- auch die Cy-3-Konzentration der Lösungen bestimmt. Für die verschiedenen Markierungs-PCRs wurden die Ausbeuten mit Formel (1) berechnet (siehe 2.2.5.2). Die durchschnittlichen Ausbeute der TEM/SHV-Markierungs-PCR betrug 2,2 µg, die der verschiedenen CTX-M-Markierungs-PCRs betrug 1,6 µg (entspricht der benötigten DNA-Menge für ca. 10 Hybridisierungen). Die Ziel-DNA-Menge war somit nicht limitierend für die folgenden Hybridisierungs-Versuche. Für Markierungs-PCRs wurde (im Gegensatz zu Standard-PCRs) nur die *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Eppendorf verwendet, da die Eigenschaften dieses Enzyms bezüglich des Einbaus Cy3-markierter Nukleotide aus früheren Arbeiten hinlänglich bekannt waren (Barl et al. 2008; Grimm et al. 2004; Leinberger

et al. 2005). Die Einbauraten wurden mit Formel (2) berechnet. Die Einbauraten der TEM/SHV-PCR-Produkte variierten zwischen 45 und 170 NT/Cy-3. Die durchschnittliche Einbaurate betrug 84 NT/Cy-3. Für die CTX-M-PCR-Produkte variierten die Einbauraten zwischen 56 und 173 NT/Cy-3 und somit im selben Bereich wie für die TEM/SHV-PCR-Produkte. Auch für die durchschnittliche Einbaurate wurde mit 97 NT/Cy-3 ein sehr ähnlicher Wert berechnet.

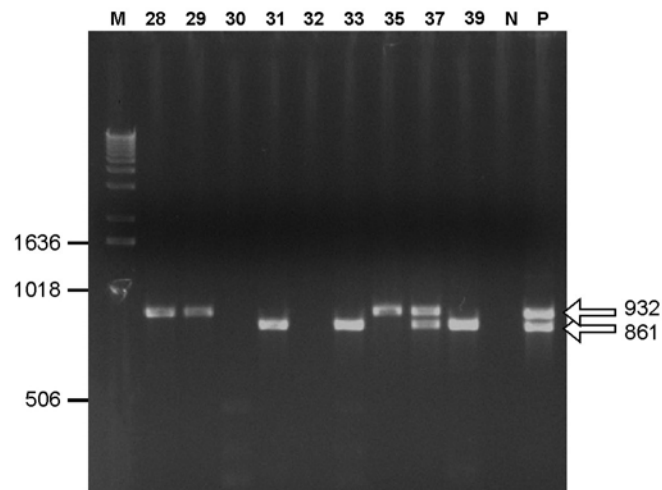


Abbildung 3-29: Dualplex-PCR zur Amplifikation von *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} mit den Primern TEM-forw, TEM-rev, SHV-forw und SHV-rev. Standard-PCR (ohne Markierung) während des Screenings der klinischen Isolate. Produktion von DNA zur späteren Sequenzierung. *Templates*: jeweils 50 ng Plasmid-DNA. M, DNA-Längenstandard; Spuren 2 - 10, verschiedene klinische Isolate; N, Negativkontrolle; P, Positivkontrolle mit Banden für *bla*_{TEM} (861 bp) und *bla*_{SHV} (932 bp).

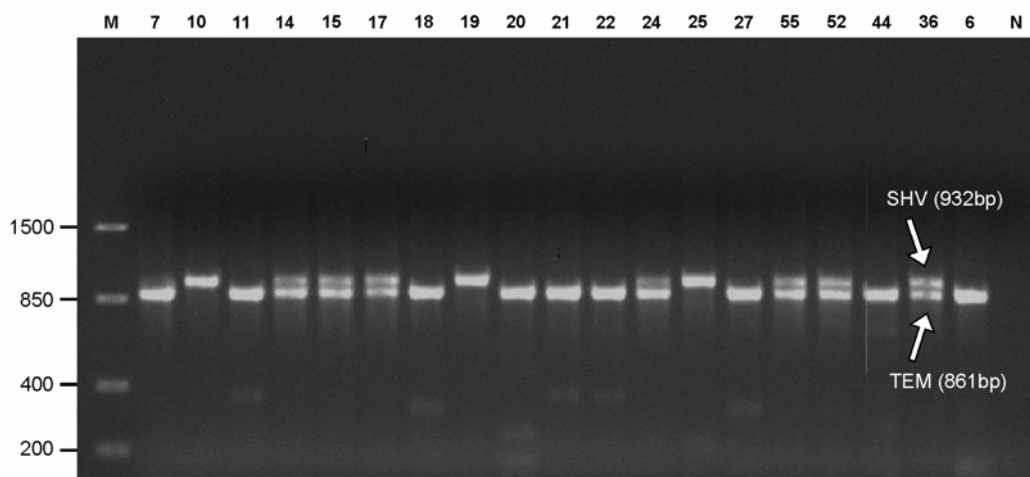


Abbildung 3-30: Dualplex-PCR zur Amplifikation und Markierung von *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} mit den Primern TEM-forw, TEM-rev, SHV-forw und SHV-rev. Markierungs-PCR zur Produktion von Ziel-DNA zur späteren Hybridisierung. *Templates*: jeweils 50 ng Plasmid-DNA. M, DNA-Längenstandard; Spuren 2 - 20, verschiedene klinische Isolate; N, Negativkontrolle. Die erwarteten Amplikongrößen für *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} betragen 861 bzw. 932 Basenpaare.

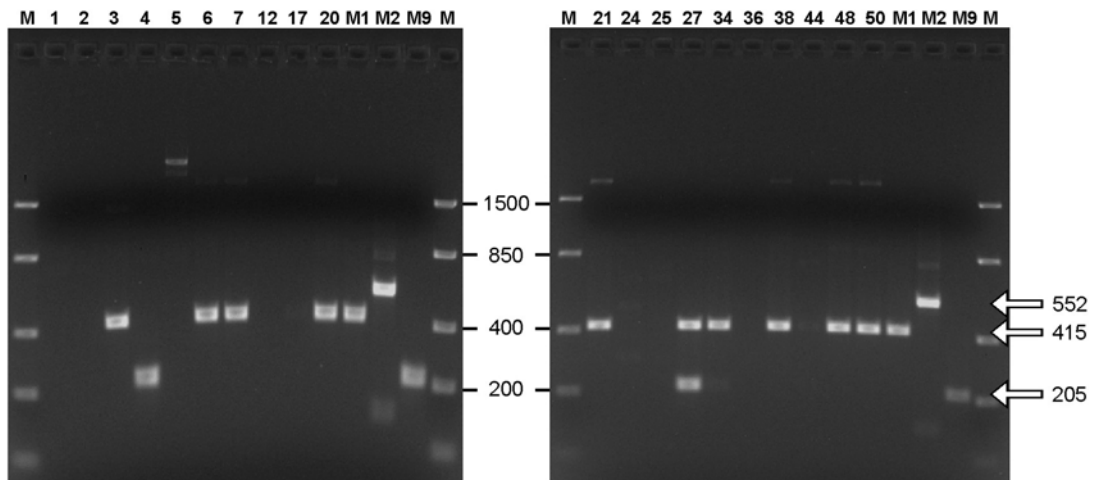


Abbildung 3-31: Multiplex-PCR mit unterschiedlichen Primern für die verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Gruppen (siehe Tabelle 2-1) zur Detektion von *bla*_{CTX-M}-Genen während des Screenings der klinischen Isolate. *Templates*: jeweils 2 µl Plasmid-DNA. M, DNA-Längenstandard; jeweils Spuren 2 - 11, verschiedene klinische Isolate; M1, M2 und M9, Positivkontrollen mit Banden für *bla*_{CTX-M}-Gruppe M1 (415 bp), M2 (552 bp) und M9 (205 bp). Die Negativkontrolle dieses Satzes an PCR-Reaktionen wurde auf ein weiteres Gel aufgetragen (nicht abgebildet) und zeigte keine Auffälligkeiten.

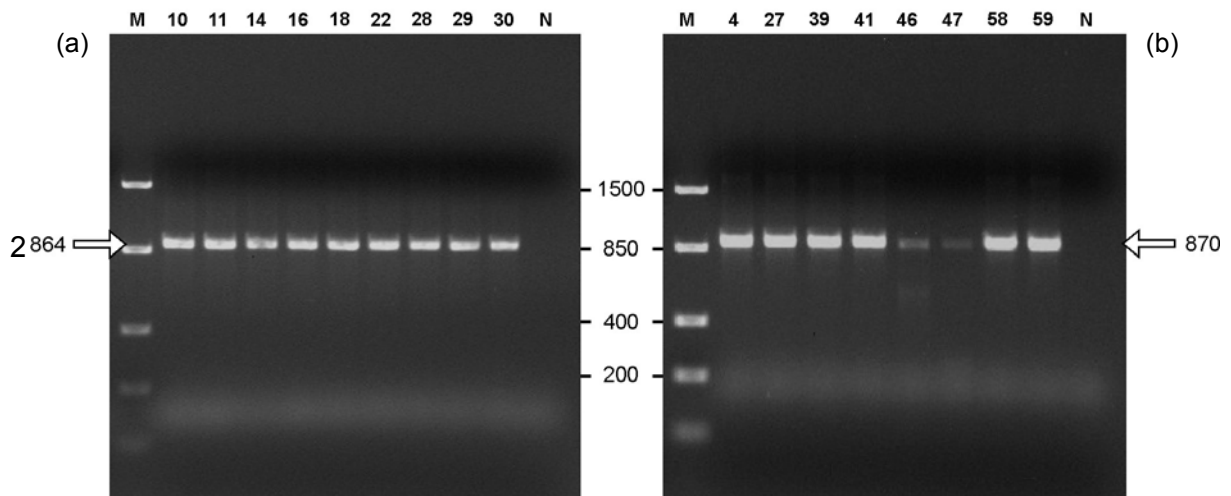


Abbildung 3-32: Amplifikation und Markierung von *bla*_{CTX-M} zur Produktion von Ziel-DNA zur späteren Hybridisierung mit Primern (a) CTX-M1-forw und CTX-M1-rev bzw. (b) CTX-M9-forw und CTX-M9-rev. *Templates*: jeweils 50 ng Plasmid-DNA. M, DNA-Längenstandard; (a) Spuren 2 - 10 bzw. (b) 2 - 9, verschiedene klinische Isolate; N, Negativkontrolle. Die erwarteten Amplikongrößen für (a) Gruppe M1 und (b) Gruppe M9 betragen 864 bzw. 870 Basenpaare.

3.1.5.2. Layout und Abdeckung

Für die Validierung mit klinischen Isolaten wurde das Layout des umgestalteten Dreifach-Chips (siehe 3.1.3, Abbildung 3-16) erweitert. Es wurden die in Kapitel 3.1.4.1 entwickelten Sondensätze zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule in Form je eines weiteren Subarrays hinzugefügt. Des Weiteren wurden die in Kapitel 3.1.4.2 überarbeiteten Sondensätze TEM 184R, TEM 237.2R, SHV 226R, SHV 238/240R und SHV 268R integriert. Das daraus resultierende Layout ist in Abbildung 3-33 dargestellt. Es umfasst 150 Sondensätze zur Charakterisierung von Polymorphismen, die für 59 beschriebene Aminosäure-Austausche der TEM-Enzyme, 53 der SHV-Enzyme und 44 der verschiedenen β -Lactamasen des CTX-M-Typs, insgesamt also 156 Substitutionen, verantwortlich sind. Der Dreifach-Chip umfasste damit Sondensätze zur Identifikation von 99 % aller bisher veröffentlichten TEM- und 89 % aller SHV-Varianten (<http://www.lahey.org/studies/>; Januar 2008). Alle Polymorphismen, die mit einem erweiterten Substratspektrum (Gniadkowski 2008) oder Inhibitor-Resistenz (Canton et al. 2008a) in Verbindung gebracht werden, wurden berücksichtigt. Die Sonden des CTX-M-Chipmoduls dienen einerseits der Unterscheidung der CTX-M-Gruppen und andererseits der Identifikation von 82 % aller bekannten CTX-M-1-ähnlichen β -Lactamasen. Die Abdeckung bezüglich der Vertreter weiterer Gruppen betrug 83 %, 50 % und 50 % aller Gruppe M2, Gruppe M9 und Gruppe M8/M25 β -Lactamasen.

3.1.5.3. Hybridisierung und Identifikation

Nach der Prozessierung der Ziel-DNA mit DNase (siehe 2.2.6) wurden die markierten PCR-Produkte mit Hilfe des Microarrays analysiert. Alle Hybridisierungen wurden unter identischen Bedingungen mit Hilfe einer Hybridisierungsstation automatisiert durchgeführt (siehe 2.2.7). Die in Kapitel 3.1.2 erlangten Erkenntnisse bezüglich der optimalen Zusammensetzung der Hybridisierungslösung (SSPE-Pufferkonzentration, SDS) und Hybridisierungstemperatur wurden berücksichtigt, so dass folgende Hybridisierungsbedingungen verwendet wurden: 2x SSPE, 0,1 % SDS, 47 °C, 1 h. Für jedes detektierte *bla*-Gen wurden normalerweise 150 ng Ziel-DNA für die Hybridisierung verwendet. War die TEM/SHV-Markierungs-PCR für beide *bla*-Gene positiv, wurden 200 ng dieses PCR-Produkts eingesetzt. Das genaue Verhältnis der TEM- und SHV-PCR-Produkte der Dualplex-PCR war nicht bekannt. Die eingesetzte Ziel-DNA-Menge variierte daher in einem engen Bereich.

Zur Identifizierung einer Variante wurden die Fluoreszenzsignale eines Chips hierarchisch ausgelesen. Die als Gruppen-spezifische Sonden fungierenden Prozesskontrollen dienen zum Nachweis der untersuchten Gene auf dem Genfamilien-Level und waren in der Lage, das Vorhandensein der verschiedenen Gene eindeutig anzuzeigen. Für die Einteilung detektierter *bla*_{CTX-M}-Gene in Untergruppen (M1, M2, M9 und M8/25) wurden vier Sondensätzen des CTX-M-Chipmoduls verwendet. In einem letzten Schritt wurde die Gen-Variante schließlich durch Auslesen der Ergebnisse der einzelnen Sondensätze identifiziert. Der hierfür nötige Abgleich der einzelnen Positionen und die Identifizierung spezifischer Polymorphismen wurde in der Datenverarbeitung so weit automatisiert, dass Unterschiede zu den als parental betrachteten Genen (TEM-1, SHV-1, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 und CTX-M-9) sofort angezeigt wurden.

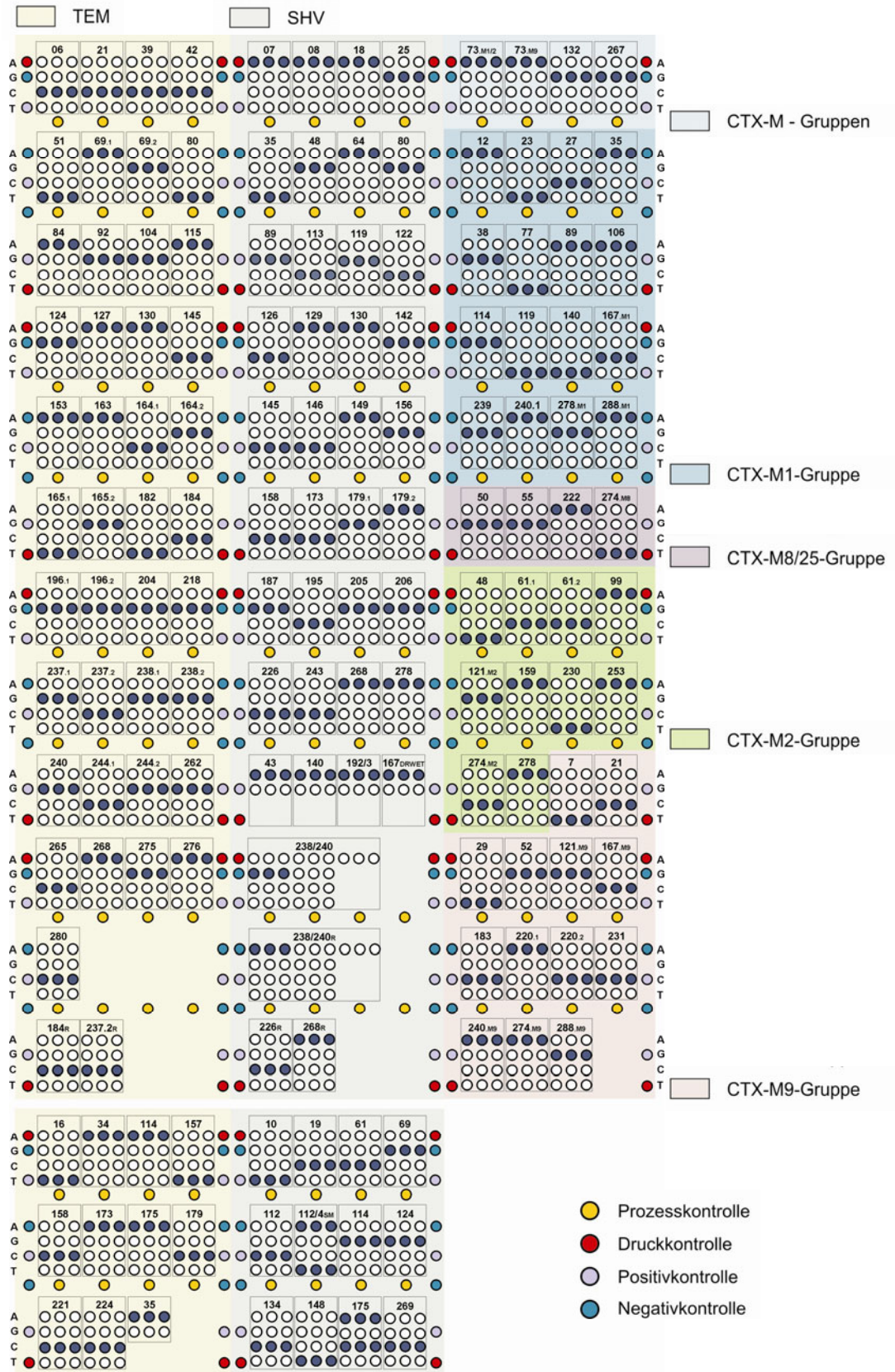


Abbildung 3-33: Layout des Chips zur Genotypisierung von TEM-, SHV- und CTX-M- β -Lactamasegenen. Die für die verschiedenen β -Lactamase-Familien und -Gruppen (bei CTX-M) spezifischen Bereiche sind farbig markiert. Ebenfalls farbig (dunkelblau) hervorgehoben sind die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit TEM-1, SHV-1, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 und CTX-M-9 Ziel-DNA. Die Prozesskontrollen in den drei Chipmodulen entsprechen Sonden zur Gruppenidentifizierung und detektieren entweder bla_{TEM} , bla_{SHV} oder bla_{CTX-M} .

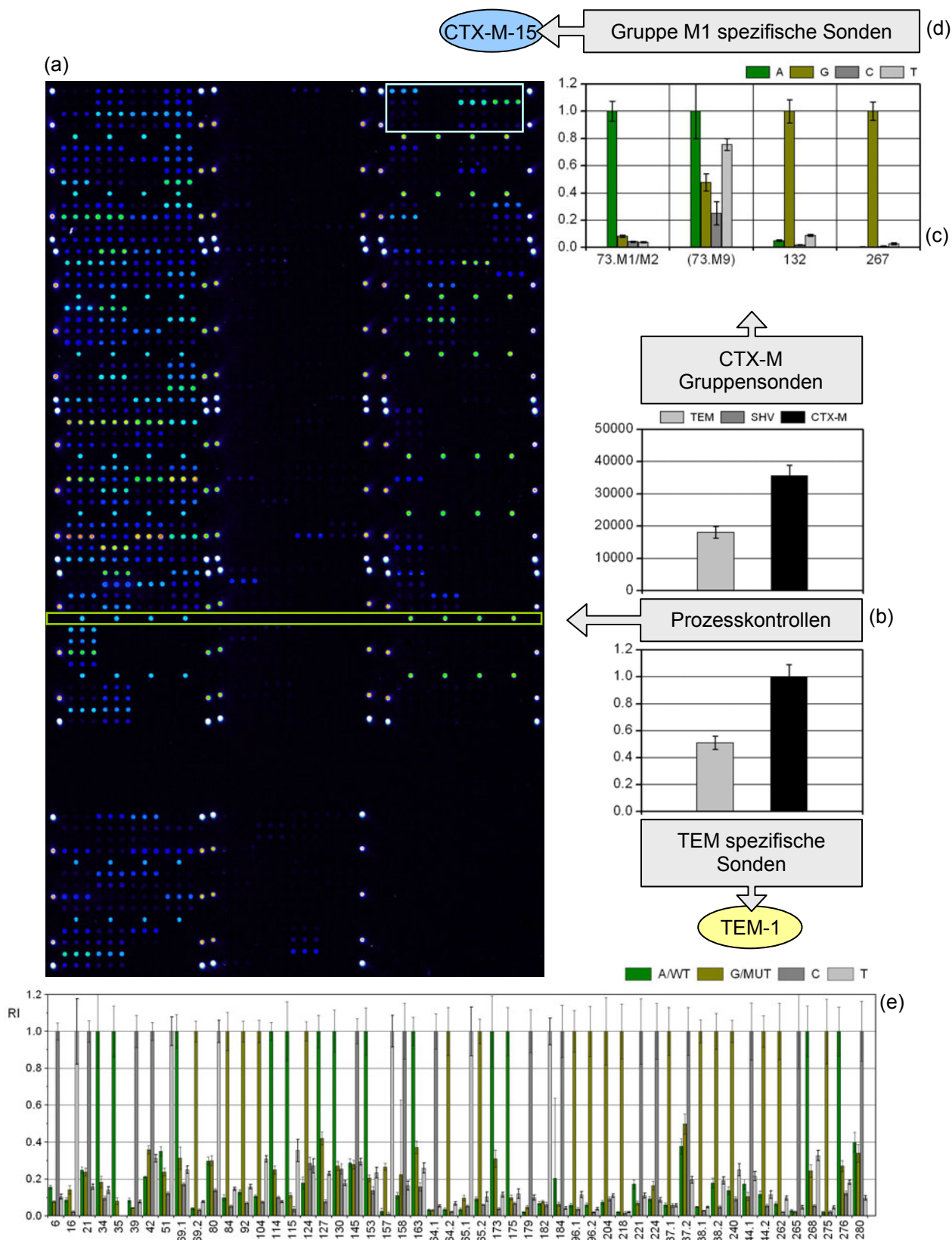


Abbildung 3-34: Hierarchische Auswertung der Fluoreszenzsignale. (a) Fluoreszenzbild nach Hybridisierung mit je 150 ng markierter TEM- und CTX-M-Ziel-DNA (Iso-48, Einbauraten: 81 NT/Cy3 bzw. 109 NT/Cy3, PE-Scanner-PMT: 60 %). (b) Relative Signale der Prozesskontrollen. (c) Relative Signale der SONDENSÄTZE zur Identifizierung der CTX-M-Gruppe. (d) und (e) Auswertung der relevanten SONDENSÄTZE zur Identifizierung der bla_{TEM} bzw. bla_{CTX-M} -Variante als TEM-1 bzw. CTX-M-15.

Abbildung 3-34 zeigt beispielhaft das Hybridisierungs-Ergebnis (Abbildung 3-34 a) und die hierarchische Auswertung für Isolat 18. Abbildung 3-34 b zeigt die absoluten Signale der Prozesskontrollen (I) und die Auswertung analog zur Auswertung eines SNP-Sondensatzes mit drei verschiedenen Sonden (in diesem Fall auf das durchschnittliche Signal der CTX-M-PK bezogenen Signale, RI). Bei den Betrachtungen der als Nachweis-Sonden konzipierten Prozesskontrollen, war die Einführung eines formalen Signal-Schwellenwertes (*Cut-off*), der für ein positives Ergebnis übertroffen werden muss, nötig, aber unkritisch, da die Prozesskontrollen untereinander keinerlei Kreuzhybridisierungen zeigten (vergleiche 3.1.5.7). Aufgrund der hohen Spezifität der Prozesskontrollen musste der *Cut-off* nur ein sich signifikant vom Hintergrund abhebendes Signal definieren. Um eine gewisse Robustheit gegenüber Artefakten der Hybridisierung zu gewährleisten und andererseits die Sensitivität des Assays nicht einzuschränken, wurde ein *Cut-off* von 500 Intensitätseinheiten verwendet. Dieser Wert ist nicht abhängig von einem anderen Signal des Arrays, sondern basiert auf Erfahrungswerten aus mehr als 120 hybridisierten Microarrays. Die Prozesskontrollen detektierten für das Isolat 18 ein *bla*_{TEM}- und *bla*_{CTX-M}-Gen. Die Zuordnung des detektierten *bla*_{CTX-M}-Gens zu einer CTX-M-Gruppe mit Hilfe der Sondensätze CTX-M 73.M1/M2, CTX-M 73.M9, CTX-M 132 und CTX-M 267 ist in Abbildung 3-34 c dargestellt. Das Muster A-(A)-G-G identifizierte das Gen als ein CTX-M-1-ähnliches Allel. Das Perfect Match des CTX-M 73.M9 Sondensatzes wurde in Klammern angegeben, da dieser Satz für Vertreter der Gruppe M9 entwickelt wurde. Er besitzt zusätzliche Mismatches zu *bla*_{CTX-M-1}-ähnlichen Genen und lieferte daher sehr niedrige Signalintensitäten. Dieses Verhalten ist aber korrekt bei Hybridisierungen mit Vertretern der Gruppen M1 oder M2. Die Identifizierungen der *bla*_{TEM}- und *bla*_{CTX-M}-Gene durch Auslesen der relevanten TEM- und CTX-M spezifischen Sondensätze als TEM-1 und CTX-M-15 sind in den weiteren Teilen der Abbildung 3-34 (d und e) dargestellt.

Die Ergebnisse der Microarray-basierten Analyse der markierten Ziel-Gene aller Isolate sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst. Alle detektierten *bla*_{TEM}-Gene zeigten das gleiche Signal-Muster wie TEM-1. Unter den *bla*_{SHV}-Genen wurden die Varianten SHV-1, SHV-12 und SHV-5 identifiziert. Als Vertreter der CTX-M-Gruppe M1 wurden CTX-M-15 und CTX-M-3 nachgewiesen, CTX-M-9, CTX-M-14 und CTX-M-14b als Vertreter der Gruppe M9. In 54 Isolaten wurden ESBLs nachgewiesen, 6 Isolate besaßen jedoch weder eine TEM-, SHV- oder CTX-M-ESBL. Unter den für *bla*_{TEM} positiven Isolaten konnte keine ESBL des TEM-Typs nachgewiesen werden. ESBLs des SHV- und CTX-M-Typs wurden in den folgenden Kombinationen detektiert: 1x CTX-M (39 Isolate / 54 ESBL-positive Isolate, 72,2 %), 1x SHV (12/54, 22,2 %), 2x CTX-M (2/54, 3,7 %) und 1x SHV + 1x CTX-M (1/54, 1,9 %). Interessanterweise handelte es sich bei den beiden *E. coli*-Isolaten, bei denen zwei CTX-M-ESBLs nachgewiesen wurden (Iso-27 und Iso-59), um Proben vom selben Patienten (Rachenabstrich und Blasenkatheterspitze). Unter den SHV-ESBLs war SHV-12 diejenige mit der größten Prävalenz (11/13, 84,6 %). Die am häufigsten detektierte CTX-M-ESBL war CTX-M-15 (34/42, 81 %). CTX-M-15 und SHV-12 waren damit auch insgesamt die am häufigsten detektierten ESBLs (CTX-M-15: 34/54; 63 %; SHV-12: 11/54, 20,4 %).

Bei 86,2 % (25/29) der *E. coli*-Isolate wurden CTX-M-ESBLs nachgewiesen. Nur ein Isolat enthielt ein *bla*_{SHV}-Gen. Die CTX-M-ESBLs der Gruppe M9 wurden mit nur einer Ausnahme (Iso-47, *P. vulgaris*) alle in *E. coli*-Isolaten detektiert. Bei drei *E. coli*-Isolaten wurden keine ESBLs detektiert. In *Klebsiella* wurden CTX-M- und SHV-ESBLs mit ähnlicher Frequenz nachgewiesen (14/26, 53,8 % und 10/26, 38,5 %). Umgekehrt wurden die meisten SHV-ESBLs in *Klebsiella*-Spezies detektiert (11/13, 84,6 %). Ein *Klebsiella*-Isolat enthielt sowohl eine SHV- als auch eine CTX-M-ESBL (Iso-49), bei einem weiteren konnte keine ESBL nachgewiesen werden (Iso-62). Während in den beiden *Enterobacter*-Isolaten entweder eine SHV- oder eine CTX-M-ESBL nachgewiesen wurde (Iso-3, Iso-24), konnte in den *Citrobacter freundii*- und im *Rahnella aquatilis*-Isolaten (Iso-23, Iso-54) keine ESBL nachgewiesen werden.

Tabelle 3-8: Genotypisierung der klinischen Isolate

Nr. ^a	Isolat	Microarray-Ergebnisse ^b			MHK			
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX	CAZ	CTX/CAZ	ESBL ^c
24 ⁺	<i>E. sakazakii</i>	TEM-1	SHV-12	-	4	32	<1	-
55 ⁺	<i>K. oxytoca</i>	TEM-1	SHV-12	-	4	8	<1	POS
25 ⁻	<i>Klebsiella spec.</i>	-	SHV-12	-	16	>=64	<1	-
2 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	16	>=64	<1	POS
12 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	>=64	>=64	-	POS
36 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	4	>=64	<1	POS
1 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	-
15 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	-
17 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	>=64	>=64	-	-
52 ⁺	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	SHV-12 + SHV-1	-	32	>=64	<1	POS
5 ⁺	<i>E. coli</i>	-	SHV-5	-	1	>=64	<1	POS
19 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-5	-	>=64	>=64	-	POS
49 ⁺	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	SHV-12	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
13 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
18 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
20 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	32	>1	POS
26 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
33 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	32	>1	NEG
38 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
40 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
48 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
60 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
61 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
6 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
9 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
30 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
32 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
34 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
57 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
3 ⁺	<i>E. intermedius</i>	-	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
29 ⁺	<i>K. oxytoca</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
7 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
16 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
37 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
10 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	-	-	-	POS
35 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
42 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
11 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	16	>1	POS
22 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
50 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	POS
14 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
28 ⁺	<i>K. terrigena</i>	-	SHV-1	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
21 ⁺	<i>K. terrigena</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
51 ⁺	<i>Klebsiella spec.</i>	TEM-1	-	CTX-M-15	>=64	>=64	-	-
8 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-3	32	4	>1	POS
56 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-3	16	<=1	>1	POS
59 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15 + CTX-M-14b	>=64	>=64	-	POS
27 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-15 + CTX-M-14b	>=64	>=64	-	POS
4 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
39 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
58 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-14	>=64	1	>1	POS
46 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	CTX-M-9	4	>=64	<1	POS
41 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	CTX-M-9	>=64	4	>1	POS
47 ⁺	<i>P. vulgaris</i>	-	-	CTX-M-9	-	-	-	-
44 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	32	>=64	<1	POS
53 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	>=64	16	>1	POS
31 ⁺	<i>E. coli</i>	TEM-1	-	-	32	>=64	<1	POS
54 ⁺	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	32	>=64	<1	-
62 ⁺	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	SHV-1	-	-	-	-	-
23 ⁺	<i>Rahnella aquatilis</i>	-	-	-	<=1	<=1	-	-

^a Die Isolate wurden zunächst nach Genotyp und anschließend nach Spezies sortiert. Isolat-Nummern wurden nur als Bezeichnung und zur Verblindung der DNA-Proben verwendet. Die Proben wurden in ⁺ Frankfurt und ⁺ Stuttgart gesammelt.

^b Die Microarray-Ergebnisse wurden mittels DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte validiert.

^c Der VITEK ESBL-Test ist nur für *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* von der FDA anerkannt.

3.1.5.4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die mit Hilfe des Microarrays ermittelten Genotypen konnten die Phänotypen von 56 der 60 getesteten Isolate (93,3 %) erklären. Während bei 93,1 % (54/58) der zuvor als resistent charakterisierten Proben eine ESBL nachgewiesen wurde, wurde erwartungsgemäß bei keiner der als negativ bzw. nicht eindeutig charakterisierten Proben (100 %, 2/2, Iso-23 and Iso-62) eine TEM-, SHV- oder CTX-M-ESBL detektiert. Der resistente Phänotyp der übrigen vier Isolate (Iso-31, Iso-44, Iso-53 und Iso-54) konnte nicht auf das Vorhandensein eines *bla*_{TEM}⁻, *bla*_{SHV}⁻ oder *bla*_{CTX-M}⁻-Gens zurückgeführt werden. Die drei *E. coli* Isolate Iso-34, Iso-44 und Iso-53 wurden zusätzlich auf das Vorhandensein eines plasmidkodierten AmpC-β-Lactamasegens des *C. freundii*-Typs getestet. Das PCR-Screening mit den ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Primern CIT-forw und CIT-rev (Tabelle 2-1) war jedoch negativ. Bei Isolat 54 handelte es sich um ein *Citrobacter freundii*-Isolat und damit um einen AmpC-Produzenten. Eine mögliche Deregulierung des chromosomalen AmpC-Gens kann zur Überproduktion dieses Enzyms führen. Ein *bla*_{TEM}⁻, *bla*_{SHV}⁻ oder *bla*_{CTX-M}⁻-Gen wurde nicht detektiert.

Um abzuschätzen, inwiefern die bekannten Eigenschaften der detektierten ESBLs mit den in dieser Studie gemessenen minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) korrelieren, beinhaltet Tabelle 3-8 die Ceftazidim- (CAZ) und Cefotaxim- (CTX) MHK-Werte, die mit Hilfe der VITEK 2XL-Testkarte ermittelt wurden. Sowohl SHV-5 als auch SHV-12 besitzen Mutationen, die zu den Aminosäure-Substitutionen Glu240Lys und Gly238Ser führen. Die Kombination dieser Austausche führt bekanntermaßen zu einer Verschiebung des Substrat-Spektrums in Richtung Ceftazidim (Gniadkowski 2008). Für Isolate, die eines dieser Enzyme produzieren, wird im Allgemeinen ein MHK-Verhältnis CTX/CAZ < 1 beobachtet. CTX-M-Enzyme bevorzugen dagegen normalerweise Cefotaxim als Substrat. Das führt in der Regel zu einem MHK-Verhältnis CTX/CAZ > 1. Dieser Trend konnte eindeutig beobachtet werden. Lediglich ein Isolat (Iso-46) zeigte ein abweichendes Verhalten. Obwohl ein CTX-M-9-Gen nachgewiesen wurde, lag das MHK-Verhältnis CTX/CAZ < 1. CTX-M-15 besitzt die Aminosäure-Substitution Asp240Gly. Dieser Austausch ist vermutlich verantwortlich für die im Vergleich zu CTX-M-3, CTX-M-9 oder CTX-M-14 erhöhte Aktivität dieses Enzyms gegenüber Ceftazidim (Gniadkowski 2008). Auch diese Eigenschaften wurden in den CTX- und CAZ-MHK-Werten abgebildet. Die Isolate 27, 49 und 59 zeigten hohe MHKs für CTX und CAZ. Bei diesen Isolaten konnten jeweils zwei verschiedene ESBLs nachgewiesen werden. Die vermittelten Resistenzspektren scheinen sich zu ergänzen. Einige weitere Isolate zeigten für sowohl CTX als auch CAZ maximale MHKs (>= 64 mg/μl). Für diese Isolate konnte das MHK-Verhältnis CTX/CAZ nicht interpretiert werden. Der komplette VITEK-Datensatz und alle Ergebnisse der Empfindlichkeitstestungen sind in Kapitel 6.4 zusammengefasst.

Fazit: Der ESBL-Chip wurde mit klinischen Isolaten getestet, die überwiegend einen ESBL-positiven Phänotyp zeigten. Der Microarray konnte die Genotypen der Isolate auflösen und die Ergebnisse zeigten eine gute Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Folgenden Genvarianten wurden mit Hilfe des Microarray identifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt: TEM-1, SHV-1, SHV-5, SHV-12, CTX-M9, CTX-M14, CTX-M14b und CTX-M15. Die ermittelten Genotypen konnten die Phänotypen von 56 der 60 getesteten Isolate erklären. Bei vier Isolaten, die als ESBL-positiv charakterisiert wurden, konnte keine TEM-, SHV- oder CTX-M-ESBL nachgewiesen werden. ESBL-Phänotypen konnten auf ESBL-Varianten von *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} oder beiden zurückgeführt werden. Obwohl bei über 63 % der Isolate ein *bla*_{TEM}-Gen detektiert wurde, wurde keine ESBL-Variante dieses Typs identifiziert. Die am häufigsten identifizierten ESBLs waren CTX-M-15 und SHV-12. Ein Vergleich der Empfindlichkeiten der Isolate und der nachgewiesenen Gene zeigte eine starke Korrelation zwischen den gemessenen MHK-Werten und den bekannten Eigenschaften der identifizierten Varianten.

3.1.5.5. Leistungsfähigkeit der Sondensätze

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten, wurde die Leistungsfähigkeit eines einzelnen Sondensatzes definiert als das Vermögen, zwischen verschiedenen Merkmalen der Ziel-DNA zu unterscheiden. Mit einem typischen SNP-Sondensatz sollte die Identität eines bestimmten Nukleotids der Ziel-DNA-Sequenz eindeutig bestimmt werden. Die Signal-Verhältnisse der Mismatch-Sonden zur jeweiligen Perfect Match-Sonde (RI_{MM} -Werte) gaben dabei Auskunft über das Diskriminierungsvermögen eines Sondensatzes. Je niedriger der Wert für dieses Verhältnis, desto besser die Diskriminierung und eindeutiger die Identifikation. Analog zu dieser Definition wurden Signalverhältnisse bei Sondensätzen interpretiert, die umfangreichere Unterschiede in verschiedenen Allelen eines Ziel-Gens detektieren sollten (z. B. Sondensatz SHV 140). Bei der abschließenden Beurteilung der Leistungsfähigkeit der zur Testung der klinischen Isolate verwendeten Sondensätze, wurde auf einen globalen Grenzwert, der über die Verwendbarkeit eines Sondensatzes entscheidet, verzichtet. Es wurde jedoch eine Kategorisierung durchgeführt, wobei RI_{MM} -Werte $< 0,4$ als optimal und Werte $< 0,5$ als akzeptabel kategorisiert wurden (siehe 3.1.4). Sondensätze mit RI_{MM} -Werten $> 0,5$ wurden individuell betrachtet und deren Optimierungs-Potential, mit Blick auf das vorausgegangene Sondendesign, abgeschätzt.

Für die Analyse konnte auf eine große Anzahl Experimentwiederholungen zurückgegriffen werden (siehe 2.2.9). Für die Evaluierung der TEM-Sondensätze konnten 38 Hybridisierungen mit TEM-1 Ziel-DNA ausgewertet werden, für die Analyse der SHV-Sondensätze 10 Experimente mit SHV-1 Ziel-DNA, und für die CTX-M-Sondensätze 34 Hybridisierungen mit CTX-M-15 bzw. 3 - 8 mit CTX-M-14 oder -M9 Ziel-DNA. Die Datenverarbeitung erfolgte wie in Abbildung 2-1 b. Vor der Bewertung der Leistungsfähigkeit der entwickelten Microarrays wurden auf der Basis dieser Experimente die Hybridisierungseigenschaften der überarbeiteten Sondensätze abschließend bewertet (Abbildung 3-35).

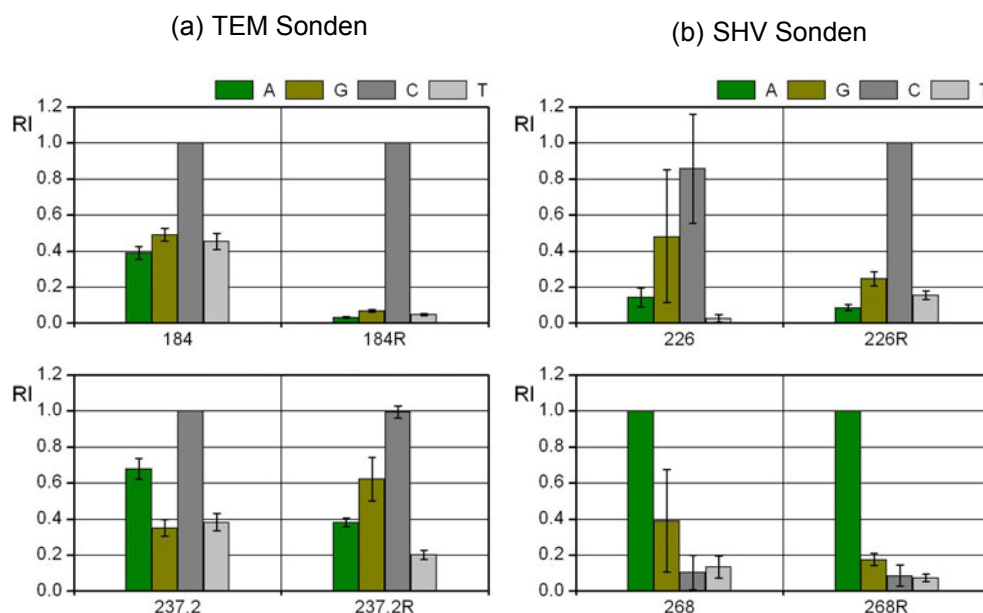


Abbildung 3-35: Vergleich der Leistungsfähigkeiten der überarbeiteten (a) TEM-Sondensätze (TEM 184R, TEM 237.2R) und (b) SHV-Sondensätze (226R, 268R) mit den jeweiligen „Ausgangs“-Sondensätzen (TEM 184, TEM 237.2, SHV 226, SHV 268).

Der Sondensatz TEM 184R zeigte wie erwartet eine deutlich verbesserte Diskriminierung. Der SHV-Sondensatz 226 konnte die entsprechenden Positionen der Ziel-DNA nicht immer korrekt identifizieren (RI der C-Sonde < 1, 0,86). Der überarbeitete Sondensatz SHV 226R zeigte dagegen eine ausgezeichnete Spezifität. Bei SHV 268 zeigte zwar im Gegensatz zu vorherigen Testhybridisierungen stets die korrekte A-Sonde das größte Signal, die G-Sonde (Mismatch) zeigte jedoch deutlich höhere Signale als die G-Sonde von SHV 268R. Die TEM 237.2 Sondensätze zeigten die erwarteten Signalmuster. Bei TEM 237.2R zeigte die G-Sonde niedrigere relative Signalintensitäten (RI = 0,62) als die A-Sonde von TEM 237.2 (RI = 0,68). TEM 237.2R identifizierte jedoch das korrekte C nicht in allen Fällen (RI < 1, 0,995). Folgende Sondensätze wurden daher für die Auswertung verwendet: TEM 184R, TEM 237.2, SHV 226R und SHV 268R. Die Leistung dieser Sonden floss damit auch in die Bewertung der Leistungsfähigkeit der Microarrays ein. Abbildung 3-36 zeigt die relativen Intensitäten von 135 relevanten TEM-, SHV- und CTX-M-Sondensätzen. Informationen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse liefern die dargestellten Standardabweichungen. Die relativen Intensitäten der jeweiligen Mismatch-Sonden variierten durchschnittlich um nur 3,3 % des jeweiligen Perfect Match-Signals ($RI_{MM} \pm 0,033$). Einzelne Maximalwerte lagen im Bereich von 14 - 21 %.

Die Leistungsfähigkeit eines kompletten Chips bzw. Chipmoduls wurde definiert als der Anteil aller Mismatch-Sonden, die relative Intensitäten (RI_{MM} -Werte) unter einem bestimmten Schwellenwert zeigten, oder als die Verteilung der relativen Intensitäten aller Mismatch-Sonden über definierte RI_{MM} -Bereiche. Abbildung 3-37 zeigt eine solche Verteilung für alle Mismatch-Sonden des kompletten Dreifach-Chips und der einzelnen Chipmodule. Die Spanne der theoretisch möglichen RI_{MM} -Werte ($0 > RI_{MM} < 1$) wurde in 10 Bereiche unterteilt (0,1 Schritte). Bei den folgenden Betrachtungen wurde der komplexe Sondensatz SHV 238/240 ausgeklammert. Dieser wird ausführlich in den Kapiteln 3.1.4.2 und 3.1.5.6 besprochen. Die Betrachtung des kompletten Chips (Abbildung 3-37 a) und der Einsatz verschiedener Schwellenwerte führte zu folgenden Ergebnissen: 94,4 % aller Mismatch-Sonden zeigten Intensitäten unter 40 % des entsprechenden Perfect Matches ($RI_{MM} < 0,4$), 97,5 % der Mismatch-Signale waren niedriger als 50 % ($RI_{MM} < 0,5$) und 99,2 % niedriger als 60 % ($RI_{MM} < 0,6$). Alle Chipmodule zeigten gleiche Verteilungen der RI_{MM} -Werte (Abbildung 3-37 b). Das SHV-Chipmodul war jedoch das spezifischste Modul mit dem höchsten Anteil von RI_{MM} -Werten unter 40 % (96,3 % vs. TEM: 94,2 % und CTX-M: 92,4 %).

Insgesamt lieferten 134 der 135 Sondensätze korrekte Ergebnisse. Damit war CTX-M 29 der einzige Sondensatz, der nicht in allen relevanten Hybridisierungen korrekte Signale lieferte. Das führte zu durchschnittlichen RI-Werten der A- und T-Sonde von 0,98 bzw. 0,63 (Perfect Match). Der höhere RI-Wert der A-Sonde und der von 1 abweichende Wert der Perfect Match-Sonde (T-Sonde) basierten auf der Tatsache, dass in 6 von 8 Fällen die nicht korrekte A-Sonde (Mismatch) die größte Signalintensität zeigte. Bezüglich der Verteilung der RI_{MM} -Werte konnten zwei der drei Werte > 0,6 auf die A- und ihre verwandte T-Sonde des CTX-M 29 Sondensatzes zurückgeführt werden. Alle weiteren Sondensätze identifizierten die in der Ziel-DNA vorhandenen Sequenzmerkmale korrekt und eindeutig. Sondensätze mit einzelnen RI_{MM} -Werten zwischen 0,5 und 0,7 waren TEM 42, TEM 280, TEM 237.2, SHV 43, CTX-M 23, CTX-M 77 und CTX-M 231.

Durch die Analyse von Kreuzhybridisierungen konnte das Versagen des Sondensatzes CTX-M 29 aufgrund des hohen Signals der A-Sonde auf einen technischen Aspekt der Array-Herstellung zurückgeführt werden. Ein Redesign ist daher nicht notwendig. Eine genauere Betrachtung dieses Sondensatzes erfolgt in Kapitel 3.1.5.7. Während TEM 42, TEM 280 und CTX-M 231 als Sondensätze mit Optimierungs-Potential bewertet wurden (Anpassung T_M / Länge / Position / künstl. Mismatches), handelte es sich bei TEM 237.2 und SHV 43 um Sondensätze, für die in dieser Arbeit bereits ein Redesign durchgeführt wurde (siehe 3.1.4.2). Für SHV 43 existiert daher bereits eine Sondensatzvariante (SHV 43R), die in das aktuelle Layout integriert werden könnte. TEM 237.2 wurde der überarbeiteten Variante

TEM 237.2R aufgrund eines günstigeren Signalmusters vorgezogen. Für diesen Sondensatz stehen daher nur noch wenige weitere Sondendesign-Optionen zur Verfügung.

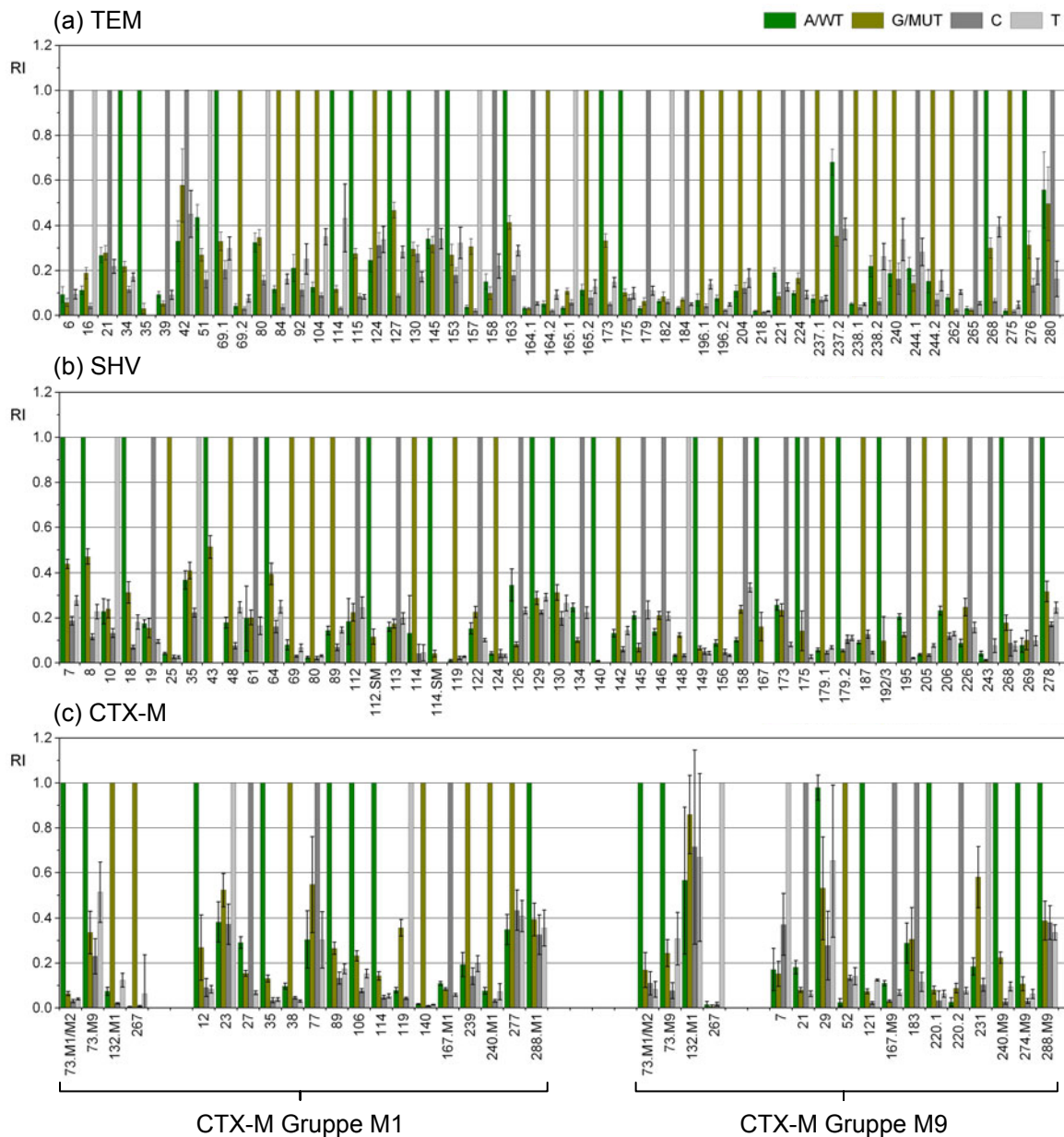


Abbildung 3-36: Evaluierung der Leistungsfähigkeit der einzelnen Sondensätze des (a) TEM-, (b) SHV- und (c) CTX-M-Chipmoduls. Zur Ermittlung der relativen Intensitäten (RI) und deren Standardabweichungen wurden die Daten aller klinischen Isolate, bei denen ein TEM-1 ($n = 38$), SHV-1 ($n = 10$), CTX-M-15 ($n = 34$) bzw. CTX-M-14/M9 ($n = 3 - 8$) Gen detektiert wurde herangezogen.

Die Diskriminierungsvermögen einiger CTX-M-Sondensätze müssen in Kombination mit den absoluten Signalintensitäten der entsprechenden Sonden betrachtet werden. Die Perfect Match-Sonden der als nicht optimal klassifizierten Sondensätze CTX-M 23 und CTX-M 77 zeigten Signalintensitäten deutlich unter 500 Intensitätseinheiten (IE). Eine Auswertung war jedoch aufgrund des optimalen Hintergrunds möglich. Da beide Sondensätze drei künstliche Mismatches zu ihrer Ziel-DNA besitzen, resultierten die niedrigen Signalintensitäten höchstwahrscheinlich aus den Änderungen der Hybridisierungsbedingungen während der Assay-Optimierung. Ein Sonden-Redesign mit dem Ziel höherer Signalintensitäten und unter

Anwendung eines deutlich konservativeren Sondendesigns (weniger/keine künstlichen Mismatches) sollte durchgeführt werden. Diese Änderungen könnten aufgrund der insgesamt höheren Stringenz der neuen Bedingungen zu einer robusteren und spezifischeren Identifizierung führen. Weitere CTX-M-Sondensätze, deren Diskriminierungsvermögen jedoch als befriedigend klassifiziert wurde, zeigten ähnliche Eigenschaften wie CTX-M 23 und CTX-M 77. Die Sondensätze CTX-M 278.M1, 288.M1 und 288.M2 lieferten Signalintensitäten < 1000 IE. Sie sollten mit dem Ziel höhere Signalintensitäten optimiert werden. Die Sondensätze CTX-M 12, CTX-M 35, CTX-M 89 (alle Gruppe M1) und CTX-M 7 (Gruppe M9) besitzen Optimierungs-Potential durch Reduktion der Anzahl an künstlichen Mismatches. Innerhalb der TEM- bzw. SHV-Chipmodule besteht kein Sonden-Optimierungsbedarf aufgrund niedriger Signalintensitäten, da alle Perfect Matches Signalintensitäten über 2000 Intensitätseinheiten zeigten.

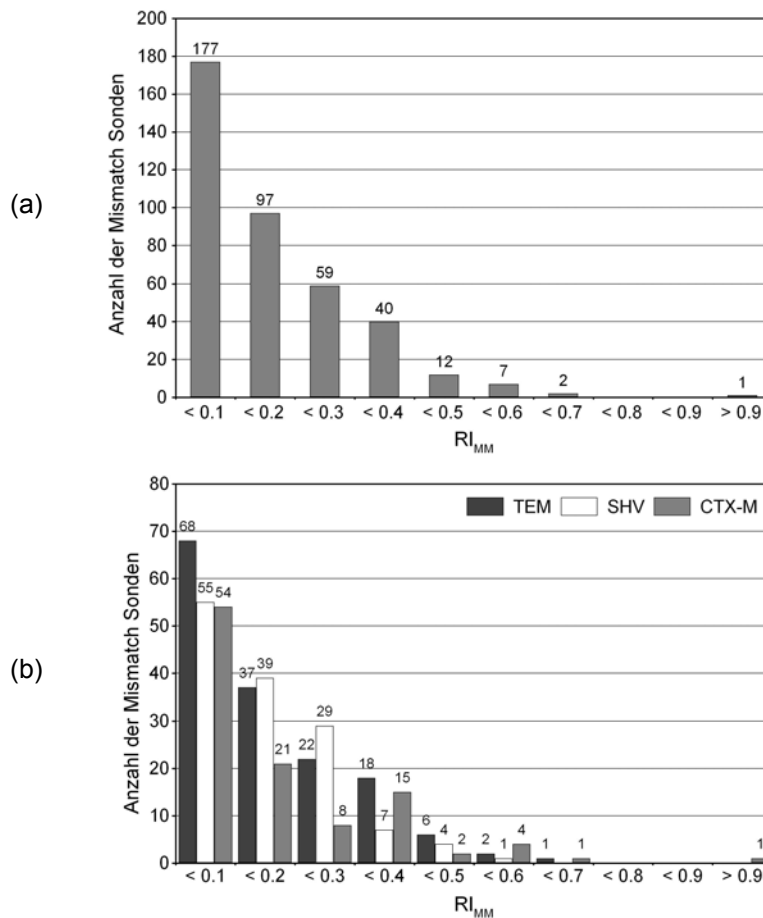


Abbildung 3-37: Evaluierung der Leistungsfähigkeit des (a) kompletten Dreifach-Chips und (b) der einzelnen Chipmodule. Die Schaubilder zeigen die Verteilung der relativen Intensitäten aller Mismatch-Sonden (RI_{MM} -Werte) über definierte RI_{MM} -Bereiche. Die Gesamtmenge der Mismatch-Sonden beträgt 394 für den kompletten Dreifach-Chip und 154, 135 und 105 für das TEM-, SHV- und CTX-M-Chipmodul. Zur Ermittlung der RI_{MM} -Werte wurden die Daten aller klinischen Isolate, bei denen ein TEM-1 ($n = 38$), SHV-1 ($n = 10$), CTX-M-15 ($n = 34$) bzw. CTX-M-14/M9 ($n = 3 - 8$) Gen detektiert wurde, gemittelt.

Fazit: Nach der Validierung des ESBL-Chips mit klinischen Isolaten wurde die Leistungsfähigkeit der einzelnen Sondensätze analysiert. Von den in Kapitel 3.1.4.2 überarbeiteten Sondensätzen wurden die Sondensätze TEM 184R, SHV 226R und SHV 268R für die Auswertung verwendet. Für die TEM-Position 237.2 wurde der ursprüngliche Sondensatz TEM 237.2 verwendet. Insgesamt lieferten alle Sondensätze korrekte Ergebnisse. Das Verhalten des Sondensatzes CTX-M 29 konnte auf ein Problem des Array-Herstellungprozesses zurückgeführt werden. 97,5 % aller Mismatch-Signale zeigten reproduzierbar Signalintensitäten von maximal 50 % der Signalintensitäten der jeweiligen Perfekt Match-Sonden. Acht der insgesamt 135 Sondensätze wurden als Sondensätze mit Optimierungspotential identifiziert.

3.1.5.6. Mischungen

Neben der gleichzeitigen Genotypisierung von TEM-, SHV- und CTX-M- β -Lactamasegenen, war der Chip auch in der Lage, Mischungen von zwei Varianten desselben β -Lactamasegens zu detektieren. In den Proben Iso-1, Iso-2, Iso-12, Iso-15, Iso-17, Iso-36 und Iso-52 wurde SHV-12 (ESBL) in der Gegenwart von SHV-1 (nicht-ESBL) nachgewiesen. Die Proben Iso-27 und Iso-59 waren positiv für jeweils zwei CTX-M-ESBLs aus unterschiedlichen CTX-M-Gruppen (M1 und M9), und zwar CTX-M-15 und CTX-M-14b (Tabelle 3-8). Für den Nachweis von Mischungen müssen die relevanten Sondensätze bei gleichzeitiger Hybridisierung ein signifikant anderes Signalmuster zeigen als bei der Detektion der einzelnen Ziel-DNAs.

Die relativen Signale (RI) der Sondensätze SHV 35 und SHV 238/240, berechnet nach Analyse aller Hybridisierungen, bei denen ein SHV-1 Gen, ein SHV-12 Gen oder beide Gene detektiert wurden, sind in Abbildung 3-38 b dargestellt. Abbildung 3-38 c zeigt als Beispiel die Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der Isolate 2, 24 und 37. Das Signalmuster bei gleichzeitiger Hybridisierung von SHV-1 und SHV-12 (Iso-2) kann deutlich als Kombination der Signalmuster für SHV-1 (Iso-37) und SHV-12 (Iso-24) wahrgenommen werden. Die Signale der T-Sonde an Position 35 und der GEG-Sonde des Sondensatzes 238/240 unterschieden sich signifikant bei gleichzeitiger oder einzelner Hybridisierung. Dies wird deutlich durch die sich nicht überlappenden 95 % Konfidenzintervalle, die anstelle von Fehlerbalken dargestellt sind. Dies entspricht einem T-Test mit einem p-Wert $< 0,05$. Der Chip konnte also klar zwischen den drei verschiedenen Situationen unterscheiden. Aufgrund der relativen Darstellung zeigte das zusätzliche Signal dieser Sonden bei Mischungen (graue Balken) keinen RI-Wert von 1 (vgl. grüne Balken), sondern darunter. Die im Vergleich großen Konfidenzintervalle sind hauptsächlich im unterschiedlichen Ziel-DNA-Mengenverhältnis der beiden SHV-Varianten begründet und zusätzlich in der geringen Anzahl an Proben ($n = 4 - 7$). Zur Validierung wurde das Ergebnis der *bla*_{SHV}-Sequenzierungen verwendet. An den relevanten Positionen waren im ABI-Elektropherogramm jeweils zwei sich überlagernde Peaks zu erkennen (z. B. Iso-2; Abbildung 3-38 a; Position 92, T + A; Position 700, G + A).

Für die Detektion von CTX-M-Lactamasen der Gruppen M1 und M9 ist vor allem der Sondensatz CTX-M 267 relevant (Gruppenidentifizierung). Abbildung 3-39 a zeigt die relativen Signale dieses Sondensatzes nach Analyse aller Hybridisierungen, bei denen ein M1-Gen, ein M9-Gen oder Gene beider Gruppen detektiert wurden. Die T-Sonde dieses Sondensatzes lieferte ebenfalls signifikant unterschiedliche Signale, wenn CTX-M-14b (als Vertreter der Gruppe M9) zusätzlich zu CTX-M-15 (als Vertreter von M1) hybridisiert wurde, im Gegensatz zu einer Hybridisierung mit CTX-M-15 alleine. Die kleine Probenanzahl für den Mischungsfall ($n = 2$) limitiert jedoch die Aussagekraft des berechneten Konfidenzintervalls. Aufgrund der sehr hohen Spezifität des Sondensatzes (alle RI_{MM} -Werte < 10 % des jeweiligen PMs, keine Kreuzhybridisierungen) kann dennoch von einer robusten Detektion von Mischungen ausgegangen werden. Die Darstellung der Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der Isolate 18, 27 und 58 in Abbildung 3-39 b unterstreicht diese Einschätzung.

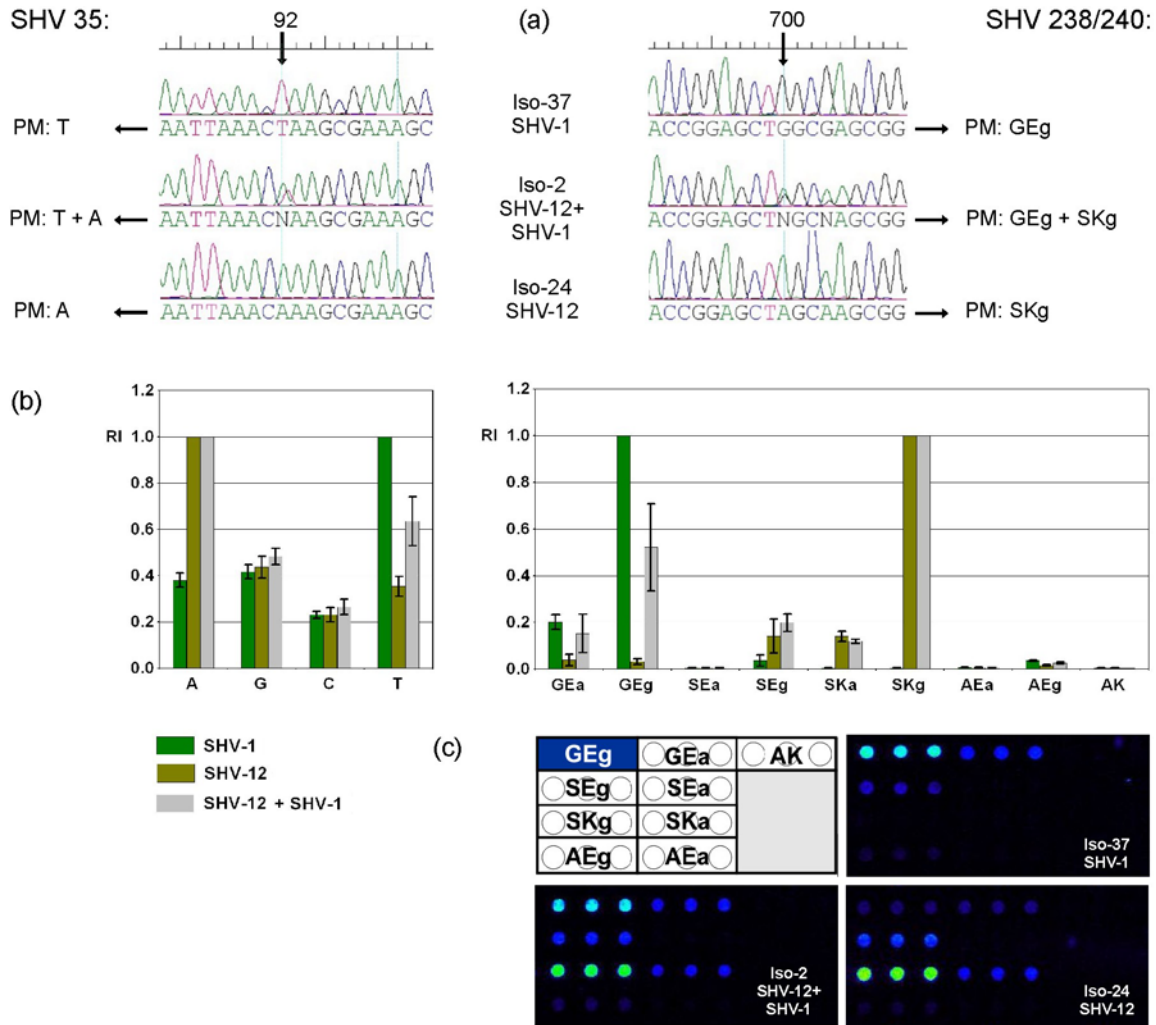


Abbildung 3-38: Mischung zweier SHV-Varianten (SHV-1 und SHV-12). (a) Ergebnis der bla_{SHV} -Sequenzierungen der Isolate 2, 24 und 37. An den relevanten Positionen sind im ABI-Elektropherogramm für Isolat 2 jeweils zwei sich überlagernde Peaks zu erkennen (92, T + A; 700, G + A). Die theoretischen Perfect Match-Sonden (PM) sind ebenfalls angegeben. (b) Die relativen Signale der Sondensätze SHV 35 und SHV 238/240 wurden berechnet nach Analyse aller Isolate, bei denen ein SHV-1 Gen ($n = 7$), ein SHV-12 Gen ($n = 4$) oder beide Gene ($n = 7$) detektiert wurden. Die Fehlerbalken stellen das 95 % Konfidenzintervall (KI_{95}) dar. (c) Layout der SHV 238/240 Sonden und Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der Isolate 2, 24 und 37.

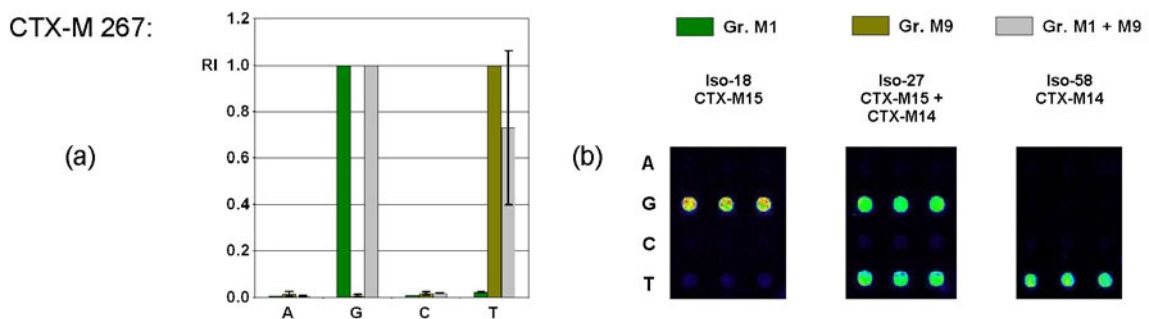


Abbildung 3-39: Mischung zweier CTX-M-Varianten unterschiedlicher CTX-M Gruppen (Gruppen M1 und M9). (a) Die relativen Signale des Sondensatzes CTX-M 267 (CTX-M Gruppen-Identifikation) wurden berechnet nach Analyse aller Isolate, bei denen ein Gruppe M1 Gen ($n = 35$), Gruppe M9 Gen ($n = 6$) oder beide Gene ($n = 2$) detektiert wurden. Die Fehlerbalken stellen das 95 % Konfidenzintervall (KI_{95}) dar. (b) Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der Isolate 18, 27 und 58.

3.1.5.7. Kreuzhybridisierungen

Abschließend wurden auf der Basis der Validierungs-Experimente, und in Anlehnung an Kapitel 3.1.4.1, Kreuzhybridisierungen zwischen den verschiedenen Chipmodulen des Dreifach-Chips untersucht. Zur Detektion der Kreuzhybridisierungen wurden die Datensätze der Isolate 53, 25, 6 und 58 verwendet. Bei diesen Experimenten wurde die Ziel-DNA nur eines einzelnen *bla*-Gentyps bzw. einer *bla*-Gengruppe hybridisiert, und zwar TEM-1 (Iso-53), SHV-12 (Iso-25), CTX-M-15 (Iso-6) und CTX-M-14 (Iso-58). Abbildung 3-40 zeigt Fluoreszenzbilder dieser Hybridisierungen. Alle Sonden, die nach der Hybridisierung mit der Ziel-DNA eines jeweils anderen Typs Signalintensitäten > 500 Intensitätseinheiten zeigten, wurden in die Analyse aufgenommen. Einige Kreuzhybridisierungssignale sind in Abbildung 3-40 mit Pfeilen und den entsprechenden Sondenbezeichnungen gekennzeichnet. Die Ziel-DNA-Menge betrug jeweils 150 ng, und die Einbauraten lagen alle nahe dem durchschnittlichen Wert für die verschiedenen PCR-Produkte (siehe 3.1.5.1).

Die Auswirkungen der detektierten Kreuzhybridisierungen auf die Leistungsfähigkeit der betroffenen SONDENSÄTZE wurde durch den Vergleich der relativen Intensitäten (RI) nach Hybridisierung mit einerseits der jeweiligen Ziel-DNA in Anwesenheit der kreuzhybridisierenden DNA (gemusterte Säulen), und andererseits der Ziel-DNA alleine (farbige Säulen), überprüft.

Die TEM-spezifischen SONDENSÄTZE nach gleichzeitiger Hybridisierung mit TEM-1- und SHV-12-Ziel-DNA im Vergleich zur Hybridisierung mit TEM-1 alleine, sind in Abbildung 3-41 a dargestellt. Keine der Kreuzhybridisierungen führte zu einer falschen Identifizierung. Ein relevanter Einfluss auf das Diskriminierungsvermögen konnte für die Kreuzhybridisierungen der G-Sonde von TEM 42 und der C-Sonde von TEM 240 nachgewiesen werden. Der SONDENSATZ TEM 42 wurde bereits zuvor als Kandidat für ein Redesign identifiziert (siehe 3.1.5.5). Der RI_{MM} -Wert der G-Sonde verschlechterte sich von 0,55 um weitere 35 % des Perfect Match-Signals auf 0,90. Während das Kreuzhybridisierungssignal der C-Sonde des viel spezifischeren SONDENSATZES TEM 240 das Diskriminierungsvermögen um 11 % verschlechterte, veränderten sich alle weiteren betroffenen SONDENSÄTZE im Durchschnitt um weniger als 4 %.

Die SHV-spezifischen SONDENSÄTZE nach gleichzeitiger Hybridisierung mit TEM-1- und SHV-12- bzw. CTX-M-15- und SHV-1-Ziel-DNA, im Vergleich zur Hybridisierung mit SHV-12 bzw. SHV-1 alleine, sind in Abbildung 3-41 b dargestellt. Die Kreuzhybridisierung der MUT-Sonde des SHV 192/3 SONDENSATZES mit TEM-Ziel-DNA wirkte sich negativ auf das Signalverhältnis aus. Der RI_{MM} -Wert verschlechterte sich von 0,02 um 33 % des Perfect Match Signals auf 0,35. Relevante Auswirkungen konnten auch für den komplexen SONDENSATZ SHV 238/240 festgestellt werden (wird nicht gezeigt in Abbildung 3-41). Der RI_{MM} -Wert der SEg-Sonde verschlechterte sich um 7 – 8 %. Der RI_{MM} -Wert der MUT-Sonde von SHV 167 wurde aufgrund einer Kreuzhybridisierung mit CTX-M Ziel-DNA ebenfalls um ca. 7 % verschlechtert. Alle weiteren betroffenen SONDENSÄTZE wurden kaum beeinflusst (Veränderung um durchschnittlich < 2 %). Die RI_{MM} -Werte aller betroffenen SHV-spezifischen SONDENSÄTZE lagen inklusive Kreuzhybridisierungen unter 0,4. Damit führte auch hier keine Kreuzhybridisierung zu einer falschen Identifizierung.

Die CTX-M-spezifischen SONDENSÄTZE nach gleichzeitiger Hybridisierung mit CTX-M-15 und SHV-1 bzw. CTX-M-14- und TEM-1-Ziel-DNA im Vergleich zur Hybridisierung mit CTX-M-15 bzw. CTX-M-14 alleine, sind in Abbildung 3-41 c dargestellt. Allgemein zeigten die CTX-M-spezifischen SONDENSÄTZE kaum Kreuzhybridisierungen mit TEM- oder SHV-Ziel-DNA. Die A-Sonden, und teilweise die G- und C-Sonden der CTX-M-SONDENSÄTZE 73.MM1/2, 114, 48 und 29 zeigten jedoch unabhängig von der hybridisierten Ziel-DNA Signale.

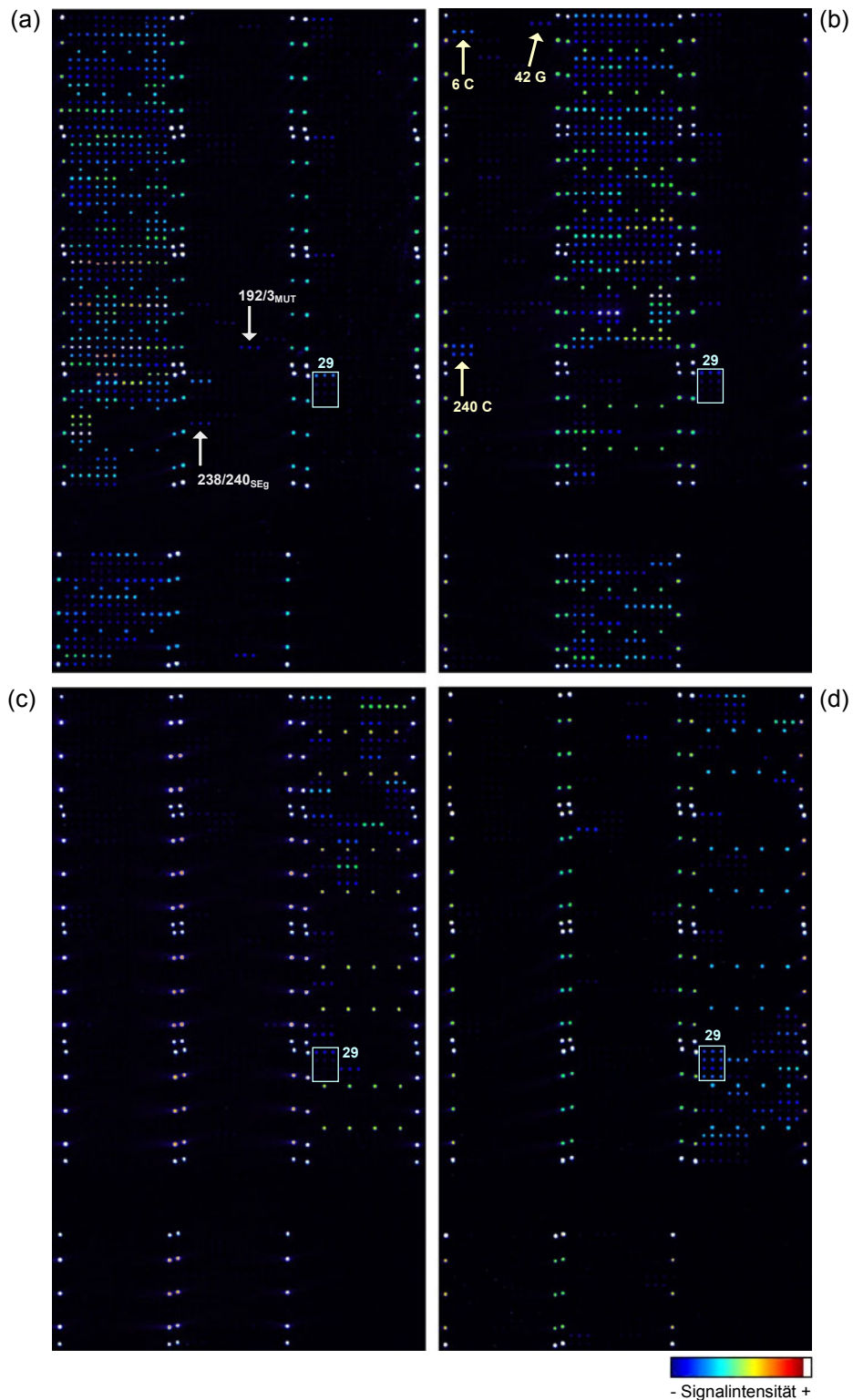


Abbildung 3-40: Kreuzhybridisierungen zwischen den verschiedenen Chipmodulen. Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit je 150 ng markierter Ziel-DNA von (a) TEM-1 (Iso-53, Einbaurrate: 78 NT/Cy3), (b) SHV-12 (Iso-25, Einbaurrate: 64 NT/Cy3), (c) CTX-M-15 (Iso-6, Einbaurrate: 116 NT/Cy3) und (d) CTX-M-14 (Iso-58, Einbaurrate: 82 NT/Cy3). Für alle Fluoreszenzbilder: PE-Scanner-PMT: 60 %. Relevante Kreuzhybridisierungssignale wurden mit Pfeilen und den entsprechenden Sondenbezeichnungen gekennzeichnet.

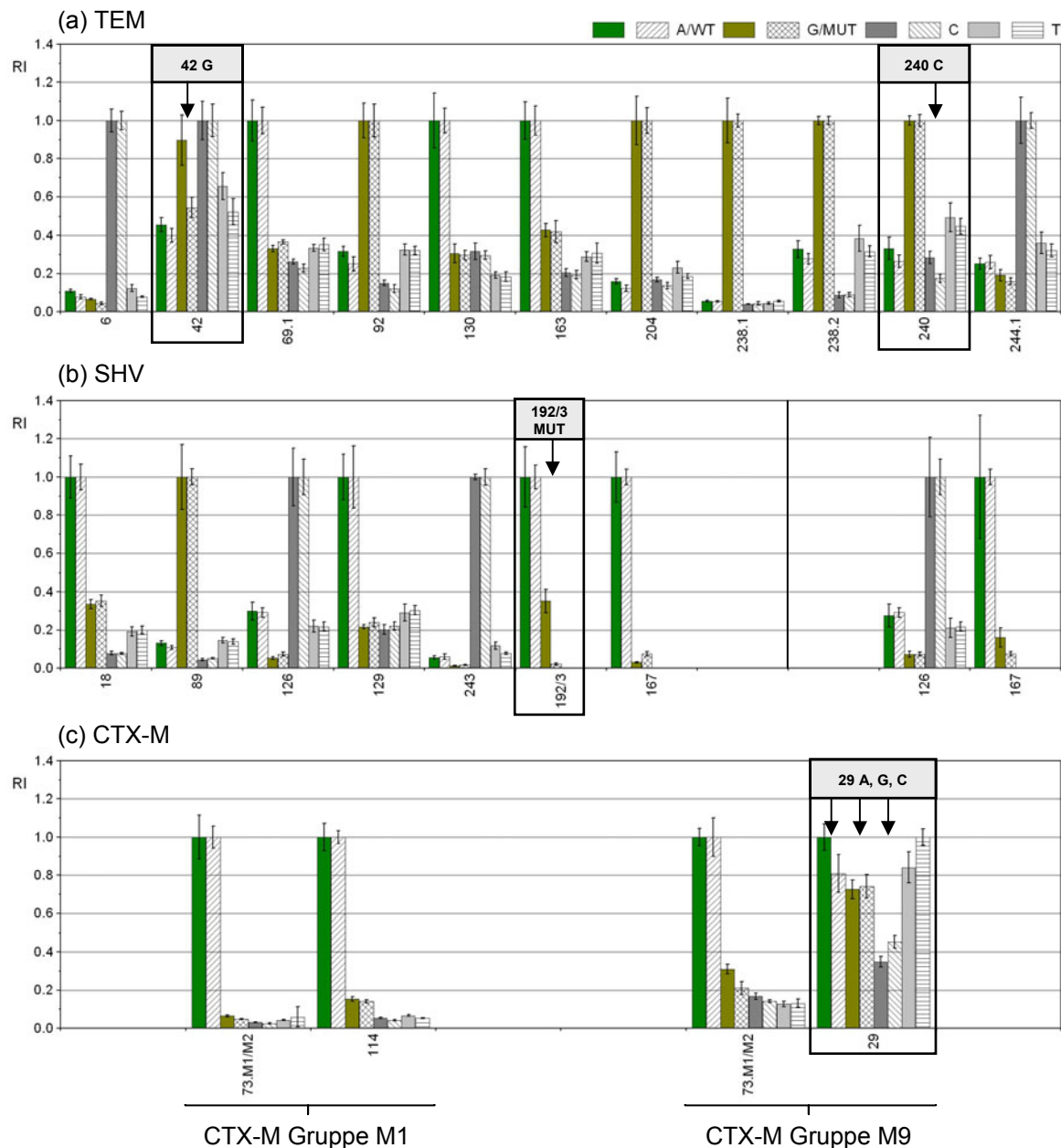


Abbildung 3-41: Einfluss der Kreuzhybridisierungen auf die Leistungsfähigkeit der betroffenen SONDENSÄTZE. Vergleich der relativen Signalintensitäten (RI) nach Hybridisierung mit der spezifischen Ziel-DNA in Gegenwart (farbige Säulen) bzw. in Abwesenheit (gemusterte Säulen) kreuzhybridisierender Ziel-DNA. (a) TEM-spezifische SONDENSÄTZE, TEM-1 und SHV-12 (Iso-55) vs. TEM-1 (Iso-53). (b) SHV-spezifische SONDENSÄTZE, (b, links) TEM-1 und SHV-12 (Iso-55) vs. SHV-12 (Iso-25), (b, rechts) SHV-1 und CTX-M-15 (Iso-10) vs. SHV-1 (Iso-62). (c) CTX-M-spezifische SONDENSÄTZE, (c, links) SHV-1 und CTX-M-15 (Iso-10) vs. CTX-M-15 (Iso-6), (c, rechts) TEM-1 und CTX-M-14 (Iso-4) vs. CTX-M-14 (Iso-58). Relevante Auswirkungen von Kreuzhybridisierungen wurden hervorgehoben.

Die genaue Betrachtung des technischen Ablaufs des Kontaktdruckverfahrens zeigte, dass es sich um diejenigen SONDENSÄTZE handelte, die nach Fertigstellung der ersten acht Subarrays als erstes gedruckt wurden. Die Fertigstellung schließt in einem letzten Schritt auch das Drucken der markierten Druckkontrollen ein. Bei den detektierten Signalen handelte es daher wahrscheinlich um unspezifische Druckartefakte oder genauer: markierte Druckkontrolle, die trotz einer aufwendigen Waschprozedur „verschleppt“ wurde. Während der Hybridisierung mit CTX-M-15 (Gruppe M1) konnte aufgrund des relativ hohen Signal-Niveaus kein Einfluss

dieser Artefakte auf die Leistungsfähigkeit der Sondensätze CTX-M 73.MM1/2 und CTX-M 114 festgestellt werden. Dies galt sowohl in An- und Abwesenheit potentiell kreuzhybridisierender DNA. CTX-M 48 wurde nicht analysiert, da keine CTX-M-Variante der Gruppe M2 detektiert wurde. Der Sondensatz CTX-M 29 wurde entscheidend durch die Signale der A-Sonde beeinflusst. Es wurde bereits beschrieben, dass bei CTX-M 29 in 6 von 8 Fällen die nicht korrekte A-Sonde (Mismatch) die größte Signalintensität zeigte. Die RI_{MM} -Werte der A-Sonde waren aber auch dann sehr hoch (z. B. 0,81, Iso-58), wenn die T-Sonde (korrektes Perfect Match) das höchste Signal zeigte (Abbildung 3-41 c, Iso-58). Die folgenden Tatsachen konnten dieses Verhalten erklären: (I) Die absoluten Signale des unspezifischen Artefakts (A-Sonde) und des spezifischen Hybridisierungs-Signals (T-Sonde) waren sehr ähnlich. (II) Beide Signale variierten leicht mit der Position des Chips innerhalb einer Druck-Charge (Artefakt) bzw. den unterschiedlichen Einbauraten der CTX-M-Ziel-DNA.

Ein Redesign von CTX-M 29 ist nicht notwendig. Durch Änderungen im Druckablauf können solche Artefakte vermieden werden. Alternativ können Änderungen des Chip-Layouts (z. B. erneutes Drucken der betroffenen Sonden an anderen Positionen innerhalb jedes Subarrays, randomisierte Anordnung der Replikate einer Sonde) den Einfluss solcher Artefakte auf die Auswertung verringern bzw. verhindern.

Kreuzhybridisierungen spielten nicht nur zwischen den verschiedenen Chipmodulen eine Rolle, sondern bei gleichzeitiger Genotypisierung verschiedener bla_{CTX-M} -Gene auch zwischen den verschiedenen Bereichen des CTX-M-Chipmoduls. Vor allem, da die Homologie der Gensequenzen der Vertreter der verschiedenen CTX-M-Gruppen untereinander größer ist als die Verwandtschaft der TEM-, SHV-, und CTX-M- β -Lactamasen (Hall und Barlow 2003). Relevante Kreuzhybridisierungen wurden bei folgenden Sonden detektiert: M1 spezifische Sonden, CTX-M 12 G, CTX-M 106 A, CTX-M 239 G, CTX-M 240.1 A; M9 spezifische Sonden, CTX-M 52 C.

Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit konnte bei gleichzeitiger Hybridisierung von CTX-M-15- und CTX-M-14b-Ziel-DNA (Iso-27 und Iso-59) bei den Sondensätzen CTX-M 12 und CTX-M 52 beobachtet werden. Der Sondensatz CTX-M 12 lieferte zwar ein korrektes Ergebnis, der RI_{MM} -Wert der G-Sonde verschlechterte sich aber von 0,16 um weitere 64 % des Perfect Match Signals (A) auf 0,80. Eine Kreuzhybridisierung der C-Sonde von CTX-M 52 (ca. 4000 Intensitätseinheiten) veränderte das Verhalten dieses Sondensatzes maßgeblich. Nach der Hybridisierung mit CTX-M-9- oder CTX-M-14-Ziel-DNA (Gruppe M9) zeigte die C-Sonde aufgrund sehr niedriger absoluter Signale auch optimale RI_{MM} -Werte (z. B. 0,01, CTX-M-14, Iso-58), und die Signalintensität der Perfect Match-Sonde (G-Sonde) lag bei über 11000 Intensitätseinheiten. Nach gleichzeitiger Hybridisierung (CTX-M-15 und CX-M 14b) zeigte der Sondensatz jedoch ein nicht eindeutiges (Iso-27, RI_{MM} -Wert C-Sonde = 0,95) bzw. falsches Ergebnis (Iso-59, C-Sonde = 1, RI_{MM} -Wert G-Sonde = 0,78).

Fazit: Obwohl einige Kreuzhybridisierungen detektiert wurden, waren entscheidende Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit der Sonden nur bei drei Sondensätzen zu erkennen. Während TEM 42 bereits zuvor als Optimierungskandidat identifiziert wurde, konnte das Versagen von CTX-M 29 auf ein leicht zu lösendes Problem der Array-Herstellung zurückgeführt werden. Es muss daher lediglich die eingeschränkte Leistungsfähigkeit von CTX-M 52 bei gleichzeitiger Genotypisierung von CTX-M- β -Lactamasegenen der Gruppen M1 und M9 in die abschließende Bewertung aufgenommen werden.

3.2. AmpC-Chipmodul

Für eine spätere Erweiterung des ESBL-Microarrays wurde in dieser Arbeit ein DNA-Microarray-Prototyp zum Nachweis und zur Identifikation von plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen entwickelt. Die Integration eines solchen AmpC-Chipmoduls wird in Zukunft den Informationsgehalt des ESBL-Chips weiter erhöhen und eine Unterscheidung von ESBL- und AmpC-vermittelter Resistenz in klinisch wichtigen gramnegativen Erregern wie *E. coli*, *Klebsiella spp.* oder *Salmonella spp.* ermöglichen. Analog zu den Chipmodulen des ESBL-Microarrays sollte der AmpC-Array in der Lage sein, alle zum Zeitpunkt des Sondendesign beschriebenen Varianten der plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen zu identifizieren.

3.2.1 Sondendesign und Layout

Die Recherche nach verfügbaren Nukleotidsequenzen plasmidkodierter *ampC*-Allele in öffentlichen Sequenz-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Abgleich mit der als Referenz verwendeten Internetseite der Lahey-Klinik (<http://www.lahey.org/studies>) führte zu Sequenzen von insgesamt 33 AmpC-Varianten der sechs verschiedenen Hauptgruppen. Aufgrund von Sequenzvergleichen konnten insgesamt 37 Polymorphismen in den Codons von 35 Aminosäurepositionen identifiziert werden, die zur Unterscheidung der einzelnen *ampC*-Allele verwendet werden können (Tabelle 3-9). Die Nummerierung dieser Positionen bezieht sich auf das erste Nukleotid des Startcodons bzw. das dadurch codierte Methionin. Dies steht im Gegensatz zu der von Bauernfeind und Kollegen vorgeschlagenen Nummerierung für CMY-1, die die Sequenz des Signalpeptids nicht berücksichtigt (Bauernfeind et al. 1996). Die Auswahl der Polymorphismen konnte nicht an Auswirkungen einzelnen Substitutionen auf das Substratspektrum des codierten Enzyms geknüpft werden, da der Wissensstand für die *ampC*-Gene der verschiedenen Gruppen zu diesem Zeitpunkt noch beschränkt war. Der in Kapitel 1.3.2 erwähnte Aminosäureaustausch Ile292Ser bei AmpCs der *Aeromonas*-Gruppe wurde berücksichtigt und entspricht Ile315Ser in Tabelle 3-9. Dieser war zum Zeitpunkt des Sondendesigns bereits für CMY-11 beschrieben worden. Bei den ausgewählten Polymorphismen handelte es sich um 31 Punktmutationen, eine Insertion von sechs Nukleotiden (nach AS 306 bei CMY-18) und um fünf Austausche von jeweils zwei Nukleotiden. In den Codons der Aminosäuren 221 und 235 der *C. freundii*-*ampC*-Gene wurden jeweils zwei verschiedene Punktmutationen beschrieben. Für die 31 Punktmutationen wurden typische SNP-Sondensätze mit jeweils vier Sonden entworfen. Die SNPs in AS 202 und 204 (ACC-Gruppe) bzw. AS 144 und 146 (DHA-Gruppe) wurden in den Varianten ACC-2 bzw. DHA-2 zusammen beschrieben und als Austausche von jeweils zwei Nukleotiden interpretiert. Für diese Positionen und die Positionen 158, 256 (FOX-Gruppe) und 196 (AER-Gruppe) wurden Sondensätze mit jeweils zwei oder drei Sonden entworfen (WT/MUT). Für Position AS 306 (CIT-Gruppe) wurde nur eine für CMY-18 spezifische Sonde entworfen. Zusätzlich wurden Gruppen-spezifische Prozesskontrollen entwickelt.

Zur Gewährleistung einer problemlosen Integration des Arrays als AmpC-Chipmodul in den ESBL-Chip, wurden für das Sondendesign ebenfalls die Kapitel 2.2.2 definierten und in Kapitel 3.1.4.1 erweiterten Parameter bezüglich Schmelztemperatur und Sekundärstrukturen vorgegeben. Insgesamt wurden für die Genotypisierung der 35 Positionen 40 Sondensätze entworfen (Tabelle 3-10). Die berechneten Schmelztemperaturen der Sonden betragen 51,4 - 59,7 °C. Für 21 der 35 Positionen und alle Prozesskontrollen konnten Sonden entworfen werden, die die folgenden unkritischen Sekundärstruktur-Parameter erfüllten: $\Delta G_{\text{Haarnadel}} \geq -0,9$ kcal/mol and $\Delta G_{\text{Dimer}} \geq -8$ kcal/mol. Für die restlichen 14 Positionen innerhalb der verschiedenen *ampC*-Gengruppen war es nicht möglich, Sonden mit optimalen thermodynamischen Parametern zu entwickeln (AmpC 180_{CIT}, AmpC 221.1_{CIT}, AmpC 235_{CIT}, AmpC 313_{CIT}, AmpC 306_{CIT}, AmpC 105_{FOX}, AmpC 194_{ENT}, AmpC 149_{DHA}, AmpC 85_{AER}, AmpC 124_{AER}, AmpC 196_{AER}, AmpC 302_{AER}, AmpC 339_{AER}). Während bei den Positionen AmpC 221.1_{CIT}, AmpC 313_{CIT}, AmpC 306_{CIT}, AmpC 105_{FOX}, AmpC 196_{AER}, AmpC 302_{AER} und

AmpC 26_{ACC} hauptsächlich Probleme mit der Ausbildung von Haarnadel-Strukturen auftraten, waren die Positionen AmpC 180_{CIT}, AmpC 235_{CIT}, AmpC 194_{ENT}, AmpC 149_{DHA}, AmpC 85_{AER} und AmpC 339_{AER} vor allem von Dimeren betroffen. Auf das in Kapitel 3.1.4.1 erläuterte alternative Sondendesign wurde bei der Entwicklung der AmpC-Sonden noch nicht zurückgegriffen. Jeder Sondensatz wurde nach der Position des entsprechenden AS-Austausches benannt. Des Weiteren wurden Kürzel der *ampC*-Gengruppen angefügt. Die weitere Benennung erfolgte analog zu den Sondensätzen des ESBL-Chips.

Abbildung 3-42 zeigt das aktuelle Chip-Layout. Die für die verschiedenen AmpC-Gruppen spezifischen Bereiche des Arrays sind unterschiedlich farbig markiert. Mit Hilfe einer erneuten Sequenz-Recherche am Ende dieser Arbeit (2008) wurde die aktuelle Abdeckung des AmpC-Arrays ermittelt. Der AmpC Microarray umfasste Sondensätze zur Identifikation von 39 und damit ca. 76 % aller bisher veröffentlichten plasmidkodierten *ampC*-Allele. Eine Betrachtung der einzelnen Gruppen ergab folgende Werte: CIT-Gruppe, 67 %; ACC-Gruppe, 100 %; FOX-Gruppe, 83 %; ENT-Gruppe 67 %, DHA-Gruppe 67 % und AER-Gruppe, 89 %.

3.2.2 Etablierung des Systems

Für die Testung des Arrays mit Genvarianten plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen standen zwei klinische *E. coli*-Isolate mit den Bezeichnungen 40/04 und 102/04 zur Verfügung. Die Proben wurden in Form isolierter DNA vom Robert Koch Institut (RKI), Außenstelle Wernigerode, zur Verfügung gestellt. Am RKI wurde bei beiden Stämmen eine plasmidkodierte AmpC- β -Lactamase der *C. freundii*-Gruppe nachgewiesen. Für das Screening wurde eine, auf den Arbeiten von Perez-Perez und Hanson (Perez-Perez und Hanson 2002) basierende Multiplex-PCR zur Detektion von *ampC*-Genen des CIT-, DHA-, ACC- und ENT-Typs verwendet. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die Sequenzdaten ebenfalls zur Verfügung gestellt. Die Amplifikation mit den Primern CITMF und CITMR (Tabelle 3-11) führte zu einem Produkt von 462 bp. Eine vollständige Identifizierung der CMY-Variante aufgrund der daraus resultierenden partiellen Gensequenzen war nicht möglich. Die RKI-Sequenzdaten sind in Abbildung 3-47 enthalten.

Die von Perez-Perez und Hanson beschriebene Multiplex-PCR dient dem Nachweis plasmidkodierter *ampC*-Gene. Aufgrund unterschiedlich großer PCR-Produkte (190 - 520 bp) ist zusätzlich eine Identifikation der Gruppenzugehörigkeit des nachgewiesenen *ampC*-Gens möglich. Für die eindeutige Identifizierung der Varianten müssen sowohl bei der Sequenzierung als auch bei der Microarray-basierten Genotypisierung größere Genfragmente analysiert werden. Es wurde daher eine Amplifikation für *ampC*-Gene des CIT-Typs etabliert, die den gesamten ORF des *ampC*-Gens beinhaltet oder zumindest alle auf dem Microarray vertretenen und damit zur Identifikation wichtigen Positionen abdeckt. Die hierfür entwickelten Primer sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst. Zur Gewährleistung der Kompatibilität der PCR-Protokolle für die in dieser Arbeit betrachteten Resistenzgene, wurden die Primer für eine Anlagerungstemperatur von 54 °C ausgelegt. Abbildung 3-43 zeigt das Ergebnis der Amplifikation der *ampC*-Gene der beiden *E. coli*-Isolate 40/04 und 102/04. Dabei wurden verschiedene Vorwärts-Primer getestet (CIT-forw₋₃₇ vs. CIT-forw₊₃₅) und verschiedene Qualitätsstufen der isolierten DNA als *Template* verwendet (Kochüberstand vs. aufgereinigte DNA). Die Verwendung des außerhalb des ORF liegenden Primers CIT-forw₋₃₇ führte zu einer deutlich höheren Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt (1232 bp), die Verwendung aufgereinigter DNA erwartungsgemäß zu deutlich weniger Nebenprodukten. Zur Produktion der markierten Ziel-DNA für die Hybridisierung und zur Produktion von DNA für die Sequenzierung wurden daher die Primer CIT-forw₋₃₇ und CIT-rev verwendet (Abbildung 3-44). Als *Template* wurde aufgereinigte DNA verwendet. Die durchschnittliche Einbaurrate der markierten PCR-Produkte betrug 64 NT/Cy-3.

Tabelle 3-9: Polymorphismen, die für das Sondendesign des AmpC-Chipmoduls berücksichtigt wurden.

Nucleotid ^a			Aminosäure ^b			ampC - Allel
Position	Codon in:		Position	Aminosäure in		<i>C. freundii</i> – Gruppe (CIT)
	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{CMY/LAT-X}		CMY-2	CMY/LAT-X	
154	GTT	ATT	52	V	I	CMY-13
313	GTC	TTC	105	L	F	CMY-5
373	CGC	AGC	125	R	S	CMY-13
511	GCT	TCT	171	A	S	CMY-12
539	GCG	GAG	180	A	E	CMY-7; CMY-12
661	TGG	CGG	221.1	W	R	CMY-3(4); CMY-12; CMY-14; CMY-15
661	TGG	AGG	221.1	W	R	CMY-4
552	TGG	TTG	221.2	W	L	CMY-6
703	CAA	AAA	235.1	Q	K	CMY-21
704	CAA	CGA	235.2	Q	R	LAT-1; LAT-4
919	-	AACGGC	306	-	NG	CMY-18; CMY-15
939	TTG	TTT	313	L	F	CMY-17
961	GTA	ATA	321	V	I	CMY-14
1088	AGC	AAC	363	S	N	CMY-12
	<i>bla</i> _{ACC-1}	<i>bla</i> _{ACC-X}		ACC-1	ACC-X	<i>H. alvei</i> – Gruppe (ACC)
64	CTG	ATG	26	L	M	ACC-2
592	AAA	CAA	202	K	Q	ACC-2
598	CTC	ATC	204	L	I	ACC-2
	<i>bla</i> _{FOX-1}	<i>bla</i> _{FOX-X}		FOX-1	FOX-X	<i>A. sobria</i> – Gruppe (FOX)
128	GAG	GCG	43	E	A	FOX-4; FOX-5
147	ATG	ATA	49	M	I	FOX-3
314	GAG	GTG	105	E	V	FOX-3
336	CAG	CAC	112	Q	H	FOX-2
472/3	CAC	AGC	158	H	S	FOX-2; FOX-3; FOX-4; FOX-5
577	CAA	AAA	193	Q	K	FOX-2
766/7	ACC	GCC	256	T	A	FOX-3; FOX-5
766/7	ACC	GTC	256	T	V	FOX-2; FOX-4
	<i>bla</i> _{MIR-1}	<i>bla</i> _{MIR/ACT-X}		MIR-1	MIR/ACT-X	<i>Enterobacter</i> – Gruppe (ENT)
582	ATG	ATA	194	M	I	ACT-1
556	TTC	TAC	219	F	Y	MIR-2; MIR-3; ACT-1
760	CTG	GTG	254	L	V	MIR-2
792	CAG	CAC	264	Q	H	MIR-3
	<i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{DHA-X}		DHA-1	DHA-X	<i>M. morgani</i> – Gruppe (DHA)
199	ATT	GTT	67	I	V	DHA-2
437	AGC	AAC	146	S	N	DHA-2
447	GAT	GAA	149	D	E	DHA-2
	<i>bla</i> _{CMY-1}	<i>bla</i> _{CMY/MOX-X}		CMY-1	CMY/MOX-X	<i>Aeromonas</i> – Gruppe (AER)
255	GAA	GAT	85	E	D	CMY-9
371	GCC	GTC	124	A	V	CMY-8; CMY-9; MOX-1
587/8	CCC	CAG	196	P	Q	CMY-8, -8b; CMY-9; MOX-1; MOX-2
905	ACC	AGC	302	T	S	MOX-2
944	ATC	AGC	315	I	S	CMY-11
1016	ACC	AGC	339	T	S	MOX-1
1097	AAC	ATC	366	N	I	CMY-10; CMY-11

^{a, b} Die Nummerierung bezieht sich auf das erste Nucleotid des Startcodons bzw. das dadurch codierte Methionin. Die Sequenzen der jeweiligen Signalpeptide waren somit sowohl in den Nucleotid- als auch Aminosäuresequenzen enthalten. *Accession numbers* der Nucleotidsequenzen: CMY-2, X91840; ACC-1, AJ133121; FOX-1, X77455; MIR-1, M37839; DHA-1, Y16410; CMY-1, X92508.

Tabelle 3-10: Sequenzen aller Oligonukleotidsonden des AmpC-Chipmoduls

Sondenname	Sondensequenz ^a (5'-3')	Länge ^b	T _M ^c (°C)	Haarnadel ΔG ^d (kcal/mol)	Dimer ΔG ^d (kcal/mol)
CIT-spezifische Sonden					
AmpC 52 CIT	TTTTTTTTTTTTCCGTTGCCNTTATCTACCA	19	54.6	-0,33	-3,61
AmpC 105 CIT	TTTTTTTTTTTTTCGAAATTAAGNTCAGCGATCC	21	53.9	0,55	-6,34
AmpC 125 CIT	TTTTTTTTTTTTTAGGGTATCNGCCTGCTG	17	57.3	-0,24	-4,67
AmpC 171 CIT	TTTTTTTTTTTTTCGACTTTACNCTAACTCCAG	20	52.8	0,43	-3,61
AmpC 180 CIT	TTTTTTTTTTTTTGTGGCCNGCTGGC	15	59.1	-0,14	-16,64
AmpC 221.1 CIT	TTTTTTTTTTTTTGATTATGCCNGGGCTATC	19	52.6	-1,74	-6,21
AmpC 221.2 CIT	TTTTTTTTTTTTTATTATGCCNNGGGCTATCG	19	54.5	-1,74	-6,21
AmpC 235.1 CIT	TTTTTTTTTTTTTCTCCGGGANAACCTTGACG	18	55.7	0,18	-9,75
AmpC 235.2 CIT	TTTTTTTTTTTTTCTCCGGGACNACTTGACG	18	55.7	0,18	-9,75
AmpC 313 CIT	TTTTTTTTTTTTTAAGTGGCATINGCAGCG	17	56.7	-1,2	-3,61
AmpC 321 CIT	TTTTTTTTTTTTTGCCGTTGAGNTAAACCCG	18	56.6	-0,81	-4,41
AmpC 363 CIT	TTTTTTTTTTTTTGCCAAACAAAANTATCCTAAC	22	52.0	-0,21	-6,34
AmpC 306 CIT	TTTTTTTTTTTTTCAACGGCAACGGCAG	16	56.3	-2,94	-3,61
AmpC PC CIT	TTTTTTTTTTTTTGAATGAGTTACGAAGAGGCAA	21	52.6	1,14	-3,61
ACC-spezifische Sonden					
AmpC 26 ACC	TTTTTTTTTTTTTCAAGGTGCTNIGGCTGC	17	56.9	-1,08	-3,14
AmpC 202/4 _{WT} ACC	TTTTTTTTTTTTTGATTGAGAAAACCTCCTTCC	21	53.2	-0,26	-3,52
AmpC 202/4 _{MUT} ACC	TTTTTTTTTTTTTGATTGAGCAAACCTCCTTCC	21	54.0	0,93	-3,9
AmpC PC ACC	TTTTTTTTTTTTTATGATTGCGGGAAAAGTC	19	53.9	-0,94	-3,61
FOX-spezifische Sonden					
AmpC 43 FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTCAAGGNGTATCGGAT	19	52.8	-0,29	3,61
AmpC 49 FOX	TTTTTTTTTTTTTCGGGGATINCGCGTCG	15	59.7	0,38	-3,61
AmpC 105 FOX	TTTTTTTTTTTTTGGGCTTGNCGTGGATG	17	53.6	-1,29	-6,34
AmpC 112 FOX	TTTTTTTTTTTTTGTAGCCANACGCCC	15	59.2	0,35	-3,61
AmpC 158 _{WT} FOX	TTTTTTTTTTTTTFACTATCGGCACTGGTCAC	20	54.2	1,02	-3,61
AmpC 158 _{MUT} FOX	TTTTTTTTTTTTTFACTATCGGAGCTGGTCAC	20	53.7	0,12	-6,34
AmpC 158 _{WT} FOX	TTTTTTTTTTTTTFACTATCGGCACTGGTCAC	19	53.8	1,02	-3,61
AmpC 158 _{MUT} FOX	TTTTTTTTTTTTTFACTATCGGAGCTGGTCAC	19	53.3	0,12	-6,34
AmpC 193 FOX	TTTTTTTTTTTTTGCCATTGAGNAACTGATGAG	21	54.4	-0,55	-3,9
AmpC 256 _{AC} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTTACCAGGC	18	53.5	1,1	-3,61
AmpC 256 _{GC} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTTGCCAGGC	18	57.2	-0,68	-6,21
AmpC 256 _{GT} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTTCTCAGGC	18	54.0	1,1	-6,76
AmpC PC FOX	TTTTTTTTTTTTTCTACAGTCCGGTGGTTT	18	55.1	0,73	3,61
ENT-spezifische Sonden					
AmpC 194 ENT	TTTTTTTTTTTTTCAGGCCATNACGACGC	16	53.7	0,87	-9,28
AmpC 219.a ENT	TTTTTTTTTTTTTCGCATTNCGCCTGGG	15	54.4	-0,43	-3,61
AmpC 219.b ENT	TTTTTTTTTTTTTCGCATTNCGCCTGGGG	16	57.4	-0,43	-3,61
AmpC 254.a ENT	TTTTTTTTTTTTTGCGAGCTGGNTGATAGC	17	56.3	-0,75	-6,34
AmpC 254.b ENT	TTTTTTTTTTTTTGGCGAGCTGGNTGATAG	18	57.3	-0,4	-6,34
AmpC 264 ENT	TTTTTTTTTTTTTCTCTTCANCTCCCTCA	19	55.2	0,32	-4,67
AmpC PC ENT	TTTTTTTTTTTTTATCTGGCAACCTATACCGC	19	54.6	0,46	-3,61
DHA-spezifische Sonden					
AmpC 67 DHA	TTTTTTTTTTTTTGGTTTTGCGGATNTTCAGG	19	51.4	0,38	-3,91
AmpC 144/6 _{WT} DHA	TTTTTTTTTTTTTGGTAAAAAGCCGTGCGG	17	54.6	-0,35	-6,68
AmpC 144/6 _{MUT} DHA	TTTTTTTTTTTTTGGTGA AAAAACCGTGCGG	17	54.9	-0,62	-6,68
AmpC 149 DHA	TTTTTTTTTTTTTCCGTGCGGANCTGCT	15	55.3	-1,36	-6,68
AmpC PC DHA	TTTTTTTTTTTTTGCCTGTTGGTGCTCTGA	18	55.5	-0,72	-3,14
AER-spezifische Sonden					
AmpC 85.a AER	TTTTTTTTTTTTTCCCTGTTFCGANATAGGATCC	20	54.1	-0,77	-10,76
AmpC 85.b AER	TTTTTTTTTTTTTGACCCTGTTCCGANATAGGATC	21	54.1	-0,77	-6,76
AmpC 124 AER	TTTTTTTTTTTTTGGGATCCGNCTTTGACAG	18	56.0	-0,55	-10,76
AmpC 196 _{WT} AER	TTTTTTTTTTTTTTTGCCCCCTTGATGGAG	18	55.1	-0,96	-3,14
AmpC 196 _{MUT} AER	TTTTTTTTTTTTTTTGCCCAGTTGATGGAG	18	52.6	-1,96	-5,02
AmpC 302 AER	TTTTTTTTTTTTTATCCCGTCANCGAGCAG	17	57.4	-0,79	-3,61
AmpC 315 AER	TTTTTTTTTTTTTCCAAGTGANCTCGAAG	18	52.4	-0,88	-6,76

Sondenname	Sondensequenz ^a (5'-3')	Länge ^b	T _M ^c (°C)	Haarnadel ΔG ^d (kcal/mol)	Dimer ΔG ^d (kcal/mol)
AmpC 339 AER	TTTTTTTTTTTTTCGGCTCGANCAATGGC	16	57.0	-0,82	-6,76
AmpC 366 AER	TTTTTTTTTTTTTCTACCCCANCGAGGCG	16	55.6	-0,22	-3,61
AmpC PC AER	TTTTTTTTTTTTTACCTATGTCAATGTGCCGA	19	53.8	0,87	-3,61

^a Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer (siehe Tabelle) mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Für SNP-Positionen wurden jeweils vier Sonden entwickelt, die sich nur durch ihre zentrale Base unterscheiden (N = A, G, C oder T). Relevante Mutationen sind hervorgehoben und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^b Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^c Die Schmelztemperaturen wurden für diejenige Sonde eines Sets berechnet, die perfekt zur jeweiligen Wildtypvariante passt. Als Wildtyp verwendete Varianten: CMY-2 (CIT), ACC-1 (ACC), FOX-1 (FOX), MIR-1 (ENT), DHA-1 (DHA) und CMY-1 (AER).

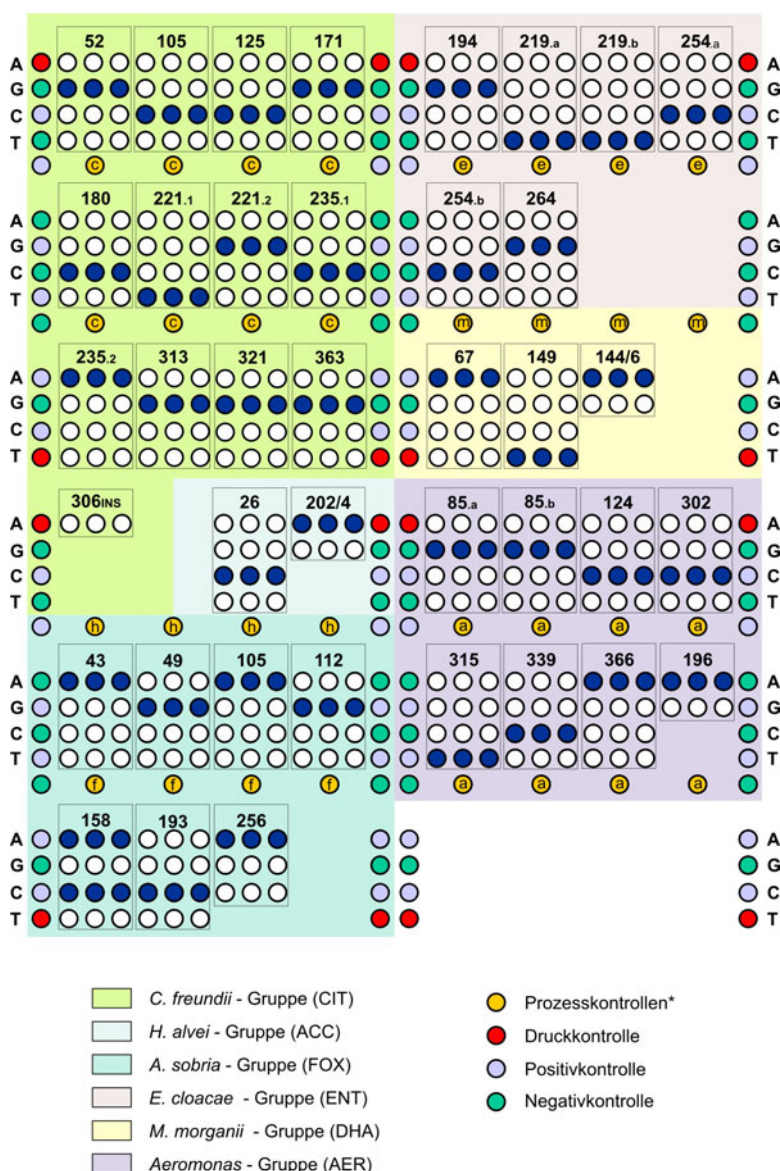


Abbildung 3-42: Layout des AmpC-Chips. Die für die verschiedenen Gruppen plasmidkodierter AmpC β-Lactamasen spezifischen Bereiche sind farbig markiert. Ebenfalls farbig (dunkelblau) hervorgehoben sind die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit CMY-2 (CIT), ACC-1 (ACC), FOX-1 (FOX), MIR-1 (ENT), DHA-1 (DHA) und CMY-1 (AER). * Die Prozesskontrollen c (CIT), h (ACC), f (FOX), e (ENT), m (DHA) und a (AER) entsprechen Sonden zur Gruppenidentifizierung.

Tabelle 3-11: Primer zur Amplifikation von Genen der *C. freundii* - Gruppe

Primernamen ¹	Primersequenz (5'-3')	T _M [°C]	Referenz
CIT-forw ₋₃₇	CGGACACCTTTTTGCTTTTAATT	52.6	diese Arbeit ²
CIT-forw ₊₃₅	TGACAGCCTCTTTCTCCA	53.0	diese Arbeit
CIT-rev	GAAAAAAGAGAAAGAAAGGAGGC	52.8	diese Arbeit ²
CITseq-forw	GAATGAGTTACGAAGAGGCAAT	52.8	diese Arbeit
CITseq-rev	AATCTTTTTGTTTCGTTCTGCG	52.1	diese Arbeit
CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	59.5	(Perez-Perez und Hanson 2002)
CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	60.1	(Perez-Perez und Hanson 2002)

¹ Nummern im Primernamen beschreiben Position des 5' Primerendes bezüglich des Startcodons

² überarbeitete Primer aus Alvarez et al. (Alvarez et al. 2004)

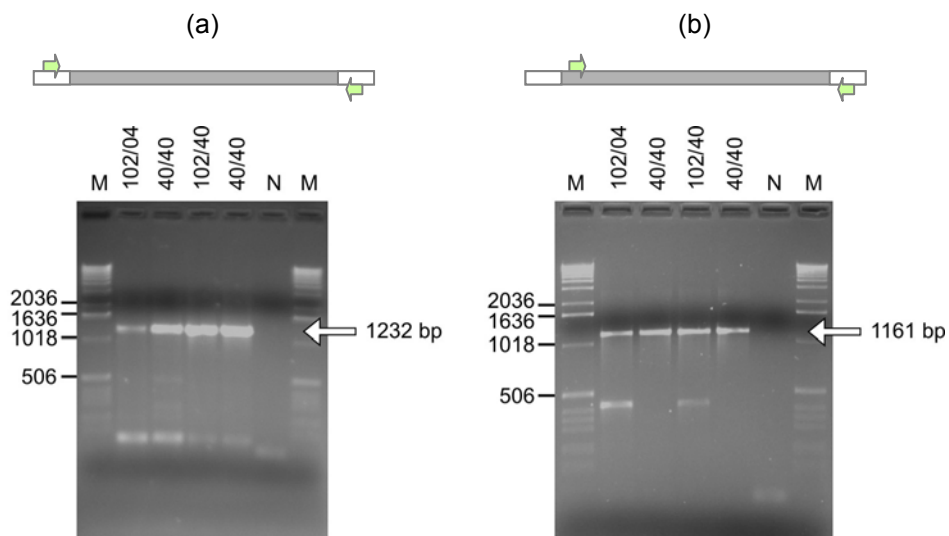


Abbildung 3-43: Amplifikation von *bla_{CMY}* (CIT-Gruppe) mit verschiedenen Primerpaaren: (a) CIT-forw₋₃₇ und CIT-rev; (b) CIT-forw₊₃₅ und CIT-rev. *Templates*: Spuren 1 + 2, jeweils 5 µl Kochüberstand; Spuren 3 + 4, jeweils 150 ng aufgereinigte DNA. M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle.

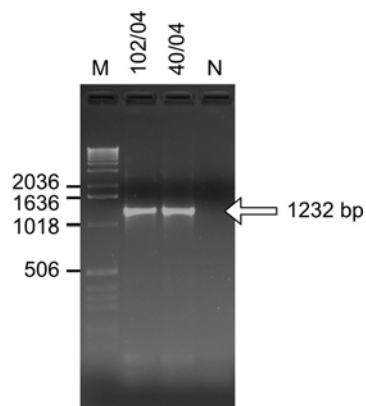


Abbildung 3-44: AmpC Markierungs-PCR (CIT-Gruppe) mit Primern CIT-forw₋₃₇ und CIT-rev. M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle. *Templates*: aufgereinigte DNA.

Nach der unspezifischen Fragmentierung der Ziel-DNA mit DNase wurden die markierten PCR-Produkte mit Hilfe des Microarrays analysiert. Aufgrund der beim Sondendesign verwendeten Parameter konnten für die Hybridisierung die gleichen Hybridisierungsbedingungen verwendet werden, welche zuvor bei der Entwicklung der verschiedenen Prototypen (TEM-, SHV, CTX-M- und OXA-Arrays) erfolgreich getestet wurden (45 °C, 6x SSPE). Die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Optimierung der Hybridisierungsbedingungen wurde zeitlich nach der Entwicklung des AmpC-Arrays durchgeführt, so dass die Erkenntnisse dieser Versuche nicht in die Etablierung des AmpC-Arrays einfließen konnten. Es wurden jeweils 150 ng Ziel-DNA eingesetzt und mit Hilfe einer Hybridisierungsstation automatisch hybridisiert (siehe 2.2.7). Abbildung 3-45 zeigt Fluoreszenzbilder der Microarrayanalyse der in den Isolaten 40/04 und 102/04 detektierten *ampC*-Gene. Ein vergrößerter Ausschnitt mit den für *ampC*-Gene der *C. freundii*-Gruppe relevanten SONDENSÄTZEN ist in Abbildung 3-49 dargestellt und die Ergebnisse der Datenauswertung dieser Experimente in Abbildung 3-46, Abbildung 3-48 und Abbildung 3-50.

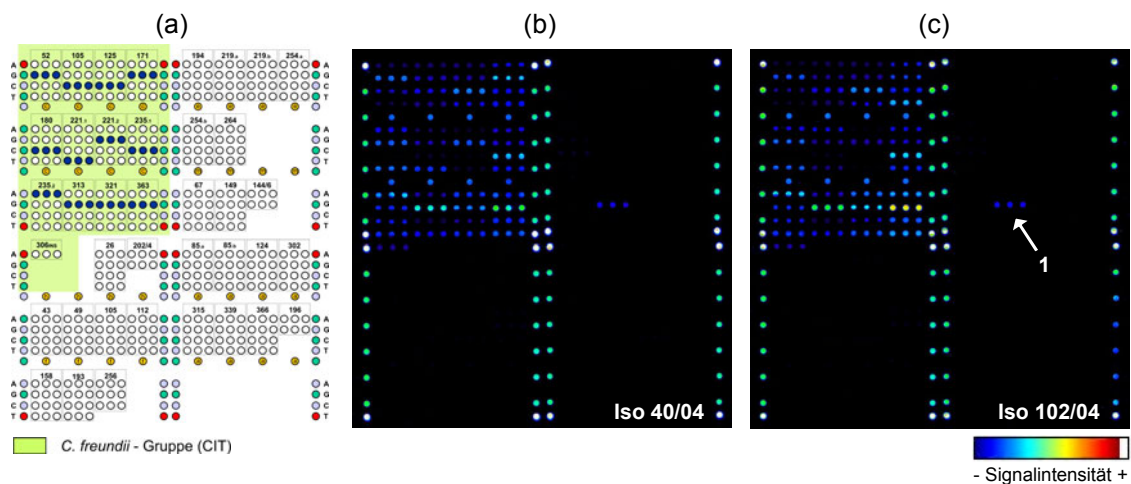


Abbildung 3-45: (a) Layout des entwickelten AmpC-Chips. Der für die *C. freundii*-Gruppe der plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen spezifische Bereich des Microarrays ist farblich markiert. Theoretische Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit CMY-2 sind dunkelblau hervorgehoben. Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit 150 ng markierter Ziel-DNA von (b) CMY-2 (Iso-40/04, Einbaureate: 62 NT/Cy3, PE-Scanner-PMT: 55 %) und (c) CMY-16 (Iso-102/04, Einbaureate: 65 NT/Cy3, PMT: 55 %). (1) Fluoreszenzsignal der AmpC 149 DHA G-Sonde.

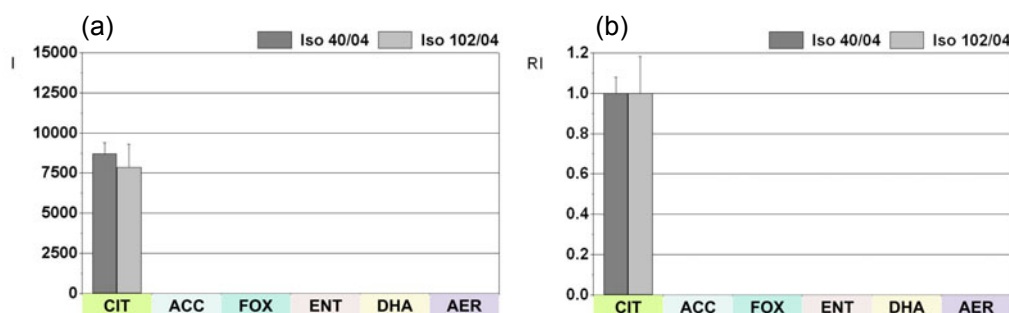


Abbildung 3-46: Quantitative Auswertung der verschiedenen Prozesskontrollen. (a) Signalintensitäten, I bzw. (b) relative Signalintensitäten, RI der Gruppen-spezifischen Prozesskontrollen. Es wurde ein Cut-Off von 300 Intensitätseinheiten verwendet. CIT (c im Array-Layout), n = 16; ACC (h), n = 8; FOX (f), n = 8; ENT (e), n = 8; DHA (m), n = 8; AER (a), n = 16.

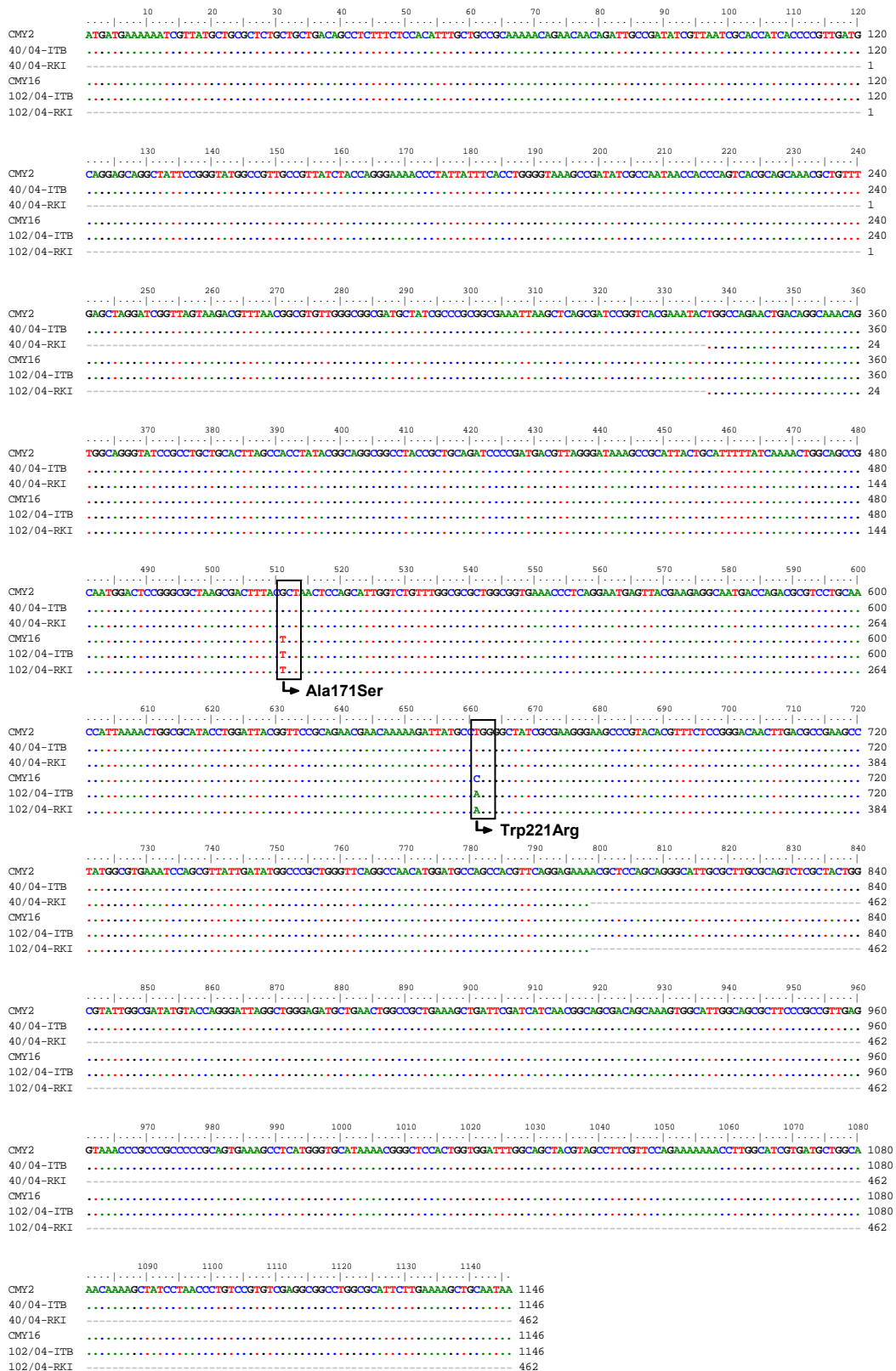


Abbildung 3-47: Nukleotidsequenzen der AmpC-Varianten CMY-2 (GenBank accession number: X91840) und CMY-16 (GenBank accession number: AJ781421) der CIT-Gruppe im Vergleich mit den Sequenzen der AmpC-Gene, die bei den Isolaten 40/04 bzw. 102/04 detektiert wurden. -ITB (Sequenzierung wurde am Institut für Technische Biochemie durchgeführt), vollständige Gensequenzen; -RKI (Sequenzen wurden vom Robert Koch Institut bereitgestellt), partielle Gensequenzen. Die relevanten Sequenzunterschiede und die daraus resultierenden Aminosäure-Austausche an den Positionen 171 und 221 sind hervorgehoben.

Zur Auswertung der Prozesskontrollen, welche als Sonden zur Gruppenidentifizierung fungierten, wurden ebenfalls relative Intensitäten (RI) berechnet. Hierzu wurden die Signalintensitäten (I, Abbildung 3-46 a) der verschiedenen Prozesskontrollen jeweils auf das höchste Signal dieser Sonden bezogen (Abbildung 3-46 b). Die hybridisierten *ampC*-Gene konnten eindeutig als Vertreter der CIT-Gruppe identifiziert werden. Dabei zeigten die anderen Prozesskontrollen (ACC, FOX, ENT, DHA und AER) keine Signale, die sich signifikant vom Hintergrund abhoben. Die Identifikation war dadurch hoch spezifisch. Parallel zur Auswertung der einzelnen SONDENSÄTZE des Chips wurden die detektierten Gene mit den Primern CIT-forw₋₃₇, CIT-rev, CITseq-forw und CITseq-rev vollständig sequenziert und als CMY-2 (40/04) bzw. CMY-16 (102/04) identifiziert (Abbildung 3-47). In der Nukleotidsequenz des *ampC*_{CMY-16}-Gens wurde im Vergleich zu einem bereits beschriebenen *ampC*_{CMY-16}-Gen eine stille Mutation im Codon für Aminosäure 221 detektiert (AGG statt TGG). Zum besseren Verständnis einiger Abbildungen wurden die Identitäten der *ampC*-Gene bereits in einigen Bildunterschriften angegeben.

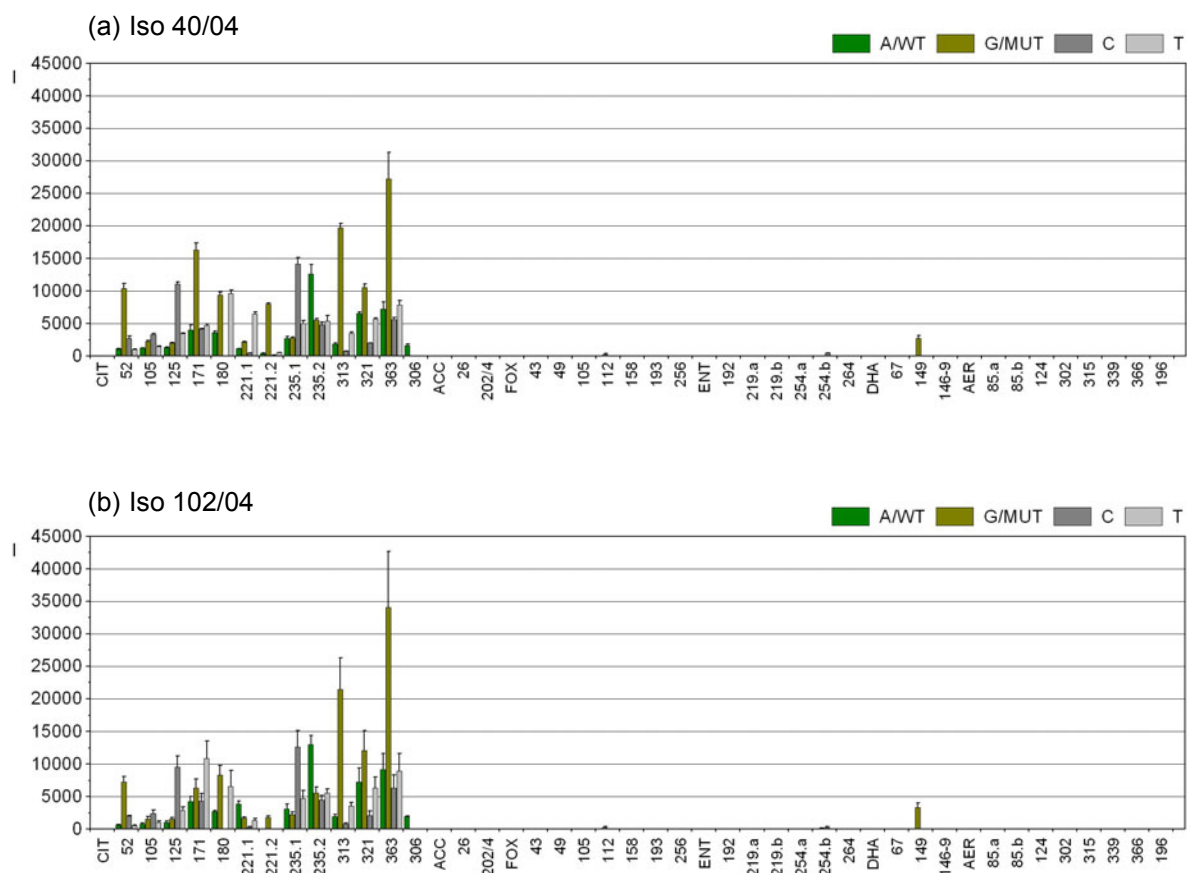


Abbildung 3-48: Quantitative Auswertung der in Abbildung 3-45 gezeigten Hybridisierung. Signalintensitäten (I) aller Sonden nach Hybridisierung mit jeweils 150 ng markierter Ziel-DNA von (a) CMY-2 (Iso-40/04, 62 NT/Cy3, n = 6) und (b) CMY-16 (Iso-102/04, 65 NT/Cy3, n = 6). Es wurde ein Cut-off von 300 Intensitätseinheiten verwendet.

Abbildung 3-48 zeigt die absoluten Signalintensitäten aller Sonden des Chips nach Hybridisierung mit markierter CMY-2- (a) und CMY-16-Ziel-DNA (b). In Abbildung 3-50 sind die relativen Signalintensitäten der für *ampC*-Gene der CIT-Gruppe spezifischen SONDENSÄTZE dargestellt. Die Hybridisierung der verschiedenen *ampC*_{CMY}-Varianten führte zu unterschiedlichen Signalmustern. Dabei zeigten die SONDENSÄTZE AmpC 171 und AmpC 221.1 unterschiedliche Ergebnisse (grüne Markierungen in Abbildung 3-50).

Während CMY-2 an diesen Positionen Nukleotide, die für Alanin (171) bzw. Tryptophan (221) codieren besitzt, ist die Kombination aus Mutationen, die zu Serin (171) bzw. Arginin (221) führen, für CMY-16 typisch (D'Andrea et al. 2006). Aufgrund der Mutation im ersten Nukleotid des Codons für AS 221 (Sondensatz 221.1) besitzt der Sondensatz AmpC 221.2 bei Hybridisierung mit CMY-16-Ziel-DNA ein Mismatch. Erwartungsgemäß führte dies zu niedrigeren Signalintensitäten von AmpC 221.2 im Vergleich zur Hybridisierung mit CMY-2-Ziel-DNA. Die Ergebnisse der Chip-Analyse stimmten mit der zuvor durch Sequenzierung bestimmten Identität der Varianten überein. Die Sondensätze AmpC 180 und AmpC 306 wurden jedoch zunächst bei der Analyse ausgeklammert. Die Leistungsfähigkeit der einzelnen Sondensätze wird im folgenden Abschnitt genau erläutert.

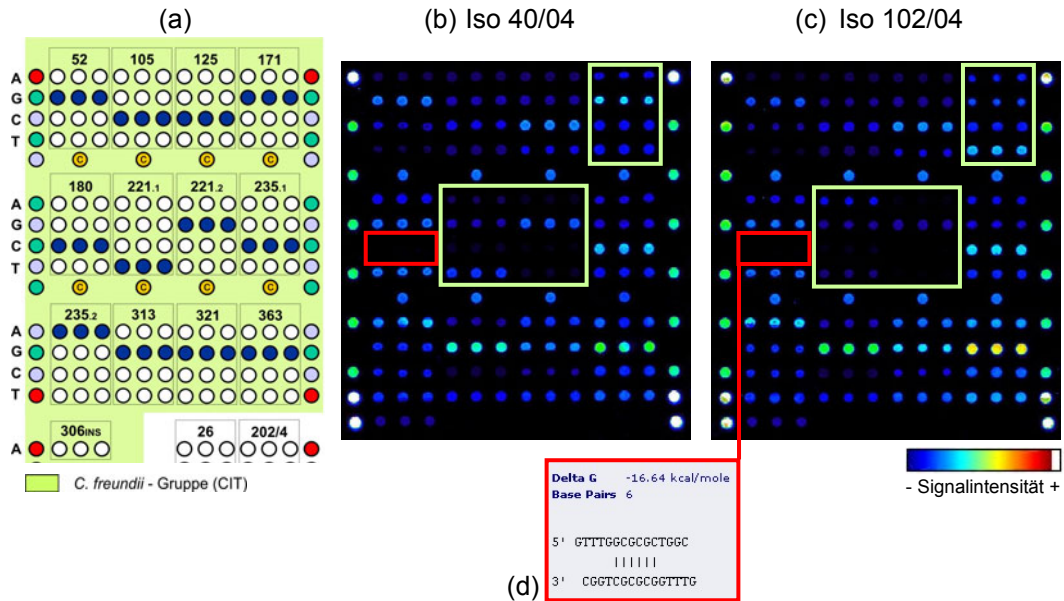


Abbildung 3-49: Vergrößerter Ausschnitt des in Abbildung 3-45 gezeigten Hybridisierungsergebnisses. (a) Layout des, für die *C. freundii*-Gruppe der plasmidkodierten AmpC β -Lactamasen spezifischen Bereichs des Microarrays. Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit (b) CMY-2 (Iso-40/04) und (c) CMY-16 (Iso-102/40). Die für die Identifikation der jeweiligen Variante relevanten Sondensätze AmpC 171 und AmpC 221 sind grün markiert. (d) Mit OligoAnalyzer berechnete Sekundärstruktur der C-Sonde des Sondensatzes AmpC 180. Die Position dieser Sonde ist rot markiert.

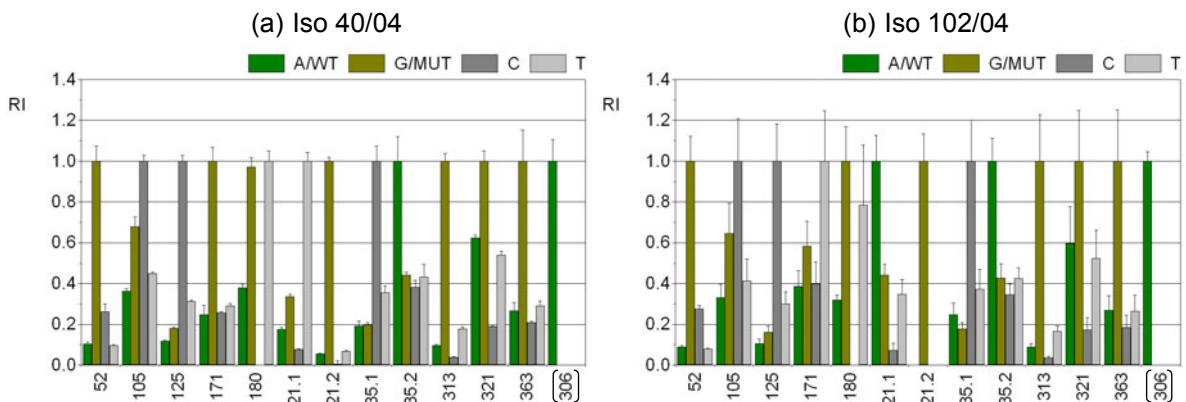


Abbildung 3-50: Relative Signalintensitäten (RI) und deren Standardabweichungen der für die *C. freundii*-Gruppe spezifischen Sondensätze nach Hybridisierung mit (a) CMY-2 (Iso-40/04) und (b) CMY-16 (Iso-102/04). Klammern: Die relative Darstellung des Sondensatzes AmpC 306_{CIT} besitzt wenig Aussagekraft (Erklärung im Text).

3.2.3 Analyse der Sondensätze

Folgende 5 der 13, für *ampC*-Gene der *C. freundii*-Gruppe spezifischen Sondensätze, zeigten optimale Eigenschaften bezüglich Signalintensität und Diskriminierung: AmpC 52, AmpC 125, AmpC 235.1, AmpC 313 und AmpC 363. Der Sondensatz AmpC 221.2 zeigte teilweise Signalintensitäten der Perfect Match-Sonde unter 2000 Intensitätseinheiten. Die niedrigen Signalintensitäten korrelierten jedoch nicht mit einer Verringerung des Diskriminierungsvermögens (RI_{MM} -Werte $< 0,4$). Der Sondensatz AmpC 306 besteht nur aus einer Sonde und muss getrennt betrachtet werden. Während die Sondensätze AmpC 221.1 und AmpC 235.1 ein verringertes Diskriminierungsvermögen im akzeptablen Bereich (RI_{MM} -Werte $< 0,5$) zeigten, lagen die RI_{MM} -Werte von AmpC 105, AmpC 171 und AmpC 321 teilweise über 0,5. Der Sondensatz AmpC 180 zeigte ein falsches Verhalten, welches allerdings mit einer Sekundärstruktur der Perfect Match-Sonde korrelierte. Die beobachteten Eigenschaften der Sondensätze AmpC 105, AmpC 171, AmpC 180, AmpC 221.1, AmpC 221.2, AmpC 235.1, AmpC 306 und AmpC 321 werden im Folgenden genauer beschrieben:

(1) Die T-Sonde des Sondensatzes AmpC 105 zeigte akzeptable RI_{MM} -Werte von ca. 0,43, die G-Sonde jedoch RI_{MM} -Werte von ca. 0,67. Insgesamt zeigte dieser Sondensatz, neben AmpC 221.2, die niedrigsten Signalintensitäten mit I_{PM} -Werten von 2400 - 3400. Dieses Verhalten konnte weder mit Sekundärstrukturen noch anderen thermodynamischen Parametern (wie z. B. T_M) korreliert werden.

(2) Der Sondensatz AmpC 171 zeigte bei Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-2}-Ziel-DNA ein optimales Verhalten (PM=G). Bei Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-16}-Ziel-DNA (PM=T) zeigte die G-Sonde einen RI_{MM} -Wert von ca. 0,58. Dieser für die Unterscheidung der beiden Varianten wichtige Sondensatz zeigte also bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-16} und *ampC*_{CMY-2} nicht das gleiche Diskriminierungsvermögen. Der Sondensatz besitzt optimale (in silico berechnete) thermodynamische Eigenschaften. Für dieses Verhalten könnten daher die kleinen, jedoch immer vorhandenen Schmelztemperaturunterschiede (2 – 3 °C) der einzelnen Sonden eines Sondensatzes verantwortlich sein.

(3) Der Sondensatz AmpC 180 zeigte ein falsches Verhalten. Aufgrund einer sehr stabilen Dimer-Struktur (Abbildung 3-49 d) wurde wahrscheinlich eine effiziente Hybridisierung der Perfect Match-C-Sonde verhindert.

(4) Die G-Sonde des für die Unterscheidung der beiden Varianten CMY-2 (PM=T) und CMY-16 (PM=A oder C) wichtigen Sondensatzes AmpC 221.1 zeigte bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-16}-Ziel-DNA einen RI_{MM} -Wert im akzeptablen Bereich (0,44) und einen optimalen Wert bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-2}. Wie bei AmpC 171 ist der Grund für dieses Verhalten wahrscheinlich in den Schmelztemperaturunterschieden der einzelnen Sonden eines Sondensatzes zu suchen.

(5) Die perfekt komplementäre G-Sonde von AmpC 221.2 zeigte bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-16}-Ziel-DNA einen I_{PM} -Wert von ca. 1800. Der Sondensatz zeigte aber ein optimales Diskriminierungsvermögen mit RI_{MM} -Werten $< 0,1$. Bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-2}-Ziel-DNA zeigte AmpC 221.2 optimale Eigenschaften. Dieses Verhalten ist dadurch zu erklären, dass das hybridisierte *ampC*_{CMY-16}-Gen im ersten Nukleotid des Codons für AS 221 eine spezifische Mutation besitzt, welche vom Sondensatz AmpC 221.1 analysiert wird. Dadurch besitzt der Sondensatz AmpC 221.2 ein Mismatch zu *ampC*_{CMY-16}, nicht jedoch zu *ampC*_{CMY-2} (s.o.).

(6) Die Sonde von AmpC 306 zeigte Signalintensitäten von ca. 1600 - 1900 Intensitätseinheiten. Dieses Signal stellt eigentlich das Mismatch-Signal (bzw. MUT-Signal) dieser Sonde dar, denn AmpC 306 besitzt 2 Mismatches zu *ampC*_{CMY-16} und *ampC*_{CMY-2} und ist spezifisch für *ampC*_{CMY-18}. Die Signalintensitäten liegen dafür in einem normalen Bereich,

vorausgesetzt, die Perfect Match-Sonde liefert deutlich höhere Signale. Dieser Sondensatz ist in dieser Form nur zu verwenden, wenn man Kenntnis über das Verhalten der Sonde bei Hybridisierungen mit perfekt komplementärer *ampC*_{CMY-18}-Ziel-DNA besitzt. Anderenfalls sollte der Sondensatz um eine Perfect Match-Sonde (bzw. WT-Sonde) erweitert werden.

(7) Der Sondensatz AmpC 321 zeigte ein nicht optimales Diskriminierungsvermögen, da die A- und T-Sonde RI_{MM} -Werte zwischen 0,53 und 0,62 zeigten. Dieses Verhalten konnte mit keinen Parametern des Sondendesigns korreliert werden.

Für die Sondensätze AmpC 180 und AmpC 306 sollte ein Redesign bzw. eine Erweiterung durchgeführt werden. Für ein Redesign von AmpC 180 stehen aufgrund des zentralen, sehr stabilen Dimers nur wenige Möglichkeiten zur Verfügung (z. B. Einbau künstlicher Fehlpaarungen, siehe 2.2.2.2). Auf AmpC 306 wurde bereits eingegangen (siehe 6.). Alle weiteren, für *ampC*-Gene der *C. freundii*-Gruppe spezifischen Sondensätze, identifizierten die jeweiligen Positionen der hybridisierten Varianten korrekt. Während die Sondensätze AmpC 105 und AmpC 321 Optimierungspotential besitzen, wurde das Verhalten der für die Unterscheidung der beiden Varianten CMY-2 und CMY-16 wichtigen Sondensätze AmpC 171, AmpC 221.1 und AmpC 221.2 als akzeptabel bewertet. Das niedrige Signal von AmpC 221.2 bei der Hybridisierung mit *ampC*_{CMY-16}-Ziel-DNA wurde erwartet und Unterschiede in den Schmelztemperaturen der einzelnen Sonden eines Sondensatzes können grundsätzlich nicht vermieden werden. Eine Überarbeitung einzelner Sondensätze bzw. die Auswahl aus redundanten Sondensätzen (z. B. AmpC 85.a_{AER} und AmpC 85.b_{AER}) ist erst nach einer Validierung des Arrays mit AmpC-Vertretern der weiteren Gruppen sinnvoll. Des Weiteren sollten die entwickelten Sonden unter den in Kapitel 3.1.2 optimierten Hybridisierungsbedingungen getestet werden.

Nach der Hybridisierung mit markierter Ziel-DNA der CIT-*ampC*-Gene wurde als einzige Kreuzreaktivität ein Signal der G-Sonde des AmpC 149_{DHA} Sondensatzes detektiert (Abbildung 3-45). Der Einfluss dieser Kreuzhybridisierung auf das Diskriminierungsvermögen des Sondensatzes bei gleichzeitiger Hybridisierung einer DHA und CIT-AmpC-Variante konnte nicht evaluiert werden, da kein *ampC*_{DHA}-Referenzmaterial zur Verfügung stand.

Fazit: Es wurde ein DNA-Microarray für den Nachweis und die Identifikation von aktuell 39 Varianten plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen entwickelt. Aufgrund der für das Sondendesign verwendeten Parameter, sollte eine Integration der entwickelten AmpC-Sonden als weiteres Chipmodul in den ESBL-Microarray problemlos möglich sein. Zur Validierung wurde der Array mit *ampC*-Genen der *C. freundii*-Gruppe getestet. Dafür wurde ein PCR-Protokoll zur Amplifizierung und Markierung von *ampC*-Genen dieser Gruppe erfolgreich etabliert. Eine abschließende Bewertung der Leistungsfähigkeit des Arrays und einzelner Sondensätze ist noch nicht möglich, da zunächst eine Validierung mit AmpC-Vertretern der weiteren Gruppen durchgeführt werden sollte. Allerdings zeigten die für die Unterscheidung der getesteten Varianten relevanten Sondensätze hervorragende Ergebnisse.

3.3. OXA-Chipmodul

Die Arbeiten zur Evaluierung eines OXA Chipmoduls und dessen Testung mit verblindeten klinischen Proben wurden während eines Forschungsaufenthalts an der University of Edinburgh Medical School, Division of Pathway Medicine, Bacterial Chips Group durchgeführt. Ausgangspunkt der Arbeiten war der von Anja Henn am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart entwickelte Microarray zur Genotypisierung von β -Lactamasen der Klasse D (Oxacillinasen) (Henn 2006). Aufgrund der großen Diversität der verschiedenen OXA-Gruppen beschränkte man sich bei der Entwicklung dieses Chips zunächst auf Sonden zum Nachweis von OXA- β -Lactamasen der Gruppen I, II und V, denen ein Großteil der OXA-ESBLs und OXA-Carbapenemasen zugeordnet wird.

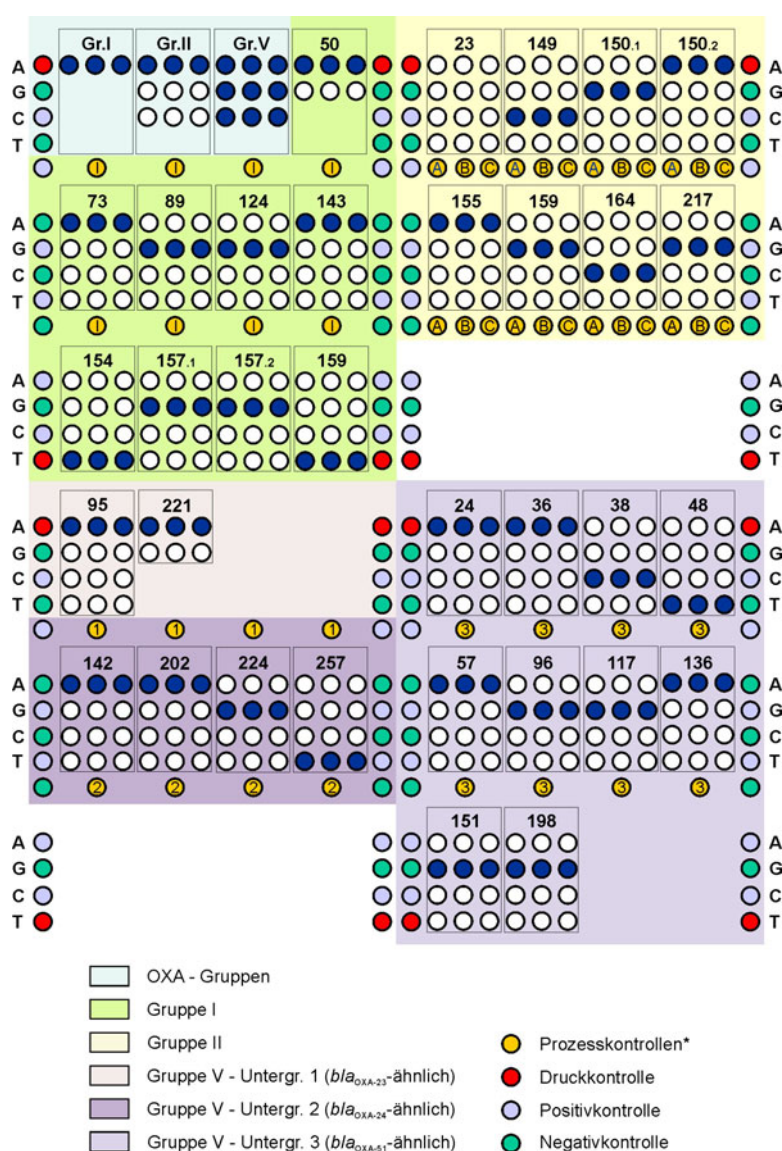


Abbildung 3-51: Layout des OXA-Chips. Die für die verschiedenen OXA-Gruppen und -Untergruppen spezifischen Bereiche sind farbig markiert. Ebenfalls farbig (dunkelblau) hervorgehoben sind die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit OXA-10 (Gruppe I), OXA-2 (Gruppe II), OXA-23, OXA-24 und OXA-51 (Untergruppen der Gruppe V). * Die Prozesskontrollen I (Gruppe I), A, B, C (Gruppe II), 1, 2 und 3 (Gruppe V) entsprechen den Sonden zur Gruppenidentifizierung.

Abbildung 3-51 zeigt das aktuelle Chip-Layout. Es beinhaltet 148 spezifische Sonden zur Identifikation von 44 verschiedenen OXA-Allelen und deren Gruppenzugehörigkeit. Die für die verschiedenen OXA-Gruppen und -Untergruppen spezifischen Bereiche des Arrays und der Bereich zur Identifikation der Gruppenzugehörigkeit sind unterschiedlich farbig markiert. Aufgrund der niedrigen Homologie der einzelnen OXA-Gene, teilweise auch innerhalb der verschiedenen Gruppen, wurden zur Genotypisierung unter anderem SONDENSÄTZE eingesetzt, die eine Mischung aus typischen SNP-SONDENSÄTZEN und Identifikationssonden darstellen. Dies gilt im Besonderen für OXA-Gruppe II. Für einen Überblick bezüglich der Spezifitäten aller SONDENSÄTZE soll an dieser Stelle auf die Arbeit von Anja Henn verwiesen werden (Henn 2006) (Tabelle 16) während hier nur die für Gruppe V spezifischen Sonden genauer erläutert werden. Eine vollständige Sondenliste des OXA-Chipmoduls befindet sich in Kapitel 6.2.3.

3.3.1 Validierung mit klinischen Isolaten

Vertreter der Gruppen I (OXA-17) und II (OXA-2 und OXA-21) wurden bereits mit dem Chip getestet und korrekt identifiziert. Durch die Testung des Arrays mit OXA-Genvarianten der Gruppe V sollte die grundsätzliche Evaluierung des aktuellen SONDENSÄTZE komplettiert werden. Zu diesem Zweck wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Chemotherapie des Zentrum für Infektionskrankheiten in Edinburgh neun verblindete *Acinetobacter baumannii*-Proben mit folgenden kryptischen Bezeichnungen zur Verfügung gestellt: Ab79, Ab64, Ab35, Ab62, Ab15, Ab38, A332, Ab33, und Ab34. Die Proben enthielten OXA-Varianten aller vier Untergruppen der Gruppe V. Die Identität der OXA-Genvarianten wurde in zuvor durchgeführten Studien mittels DNA-Sequenzierung bestimmt. Die Arbeitsgruppe um Professor Sebastian Amyes beschäftigt sich seit Jahren ausführlich mit OXA- β -Lactamasen der Gruppe V, deren Klassifizierung, Verbreitung und Rolle bezüglich der Carbapenem-Resistenz bei *A. baumannii* (Brown und Amyes 2006; Brown und Amyes 2005; Donald et al. 2000; Evans et al. 2007; Evans et al. 2008; Paton et al. 1993). Der Vergleich der Ergebnisse wurde erst nach der Microarrayanalyse durchgeführt (siehe Tabelle 3-12). Zum besseren Verständnis einiger Abbildungen wurden die Identitäten der *bla*_{OXA}-Gene jedoch in den Bildunterschriften angegeben.

Zur DNA-Extraktion wurden Kochüberstände hergestellt und als *Template* für die folgenden PCR-Untersuchungen verwendet. Für die Vervielfältigung der *bla*_{OXA}-Gene wurden die in Tabelle 2-1 beschriebenen Primerpaare verwendet. Zunächst wurde ein PCR-Screening nach Mitgliedern der Untergruppe 3 der Gruppe V (*bla*_{OXA-51}-ähnlich) mit dem Primerpaar OXA-69 durchgeführt. Bei Ab79, Ab64, Ab62, Ab15, und A332, also fünf der getesteten Isolate, war die PCR positiv (siehe Abbildung 3-52 a). Das PCR-Produkt (975 bp) beinhaltet den gesamten ORF des OXA-Gens und deckt somit alle zur Identifikation wichtigen Positionen ab bzw. lässt eine Identifikation durch Sequenzierung zu (Heritier et al. 2005). Dieses Primerpaar wurde daher auch zur Produktion der markierten Ziel-DNA für die Hybridisierung verwendet (siehe Abbildung 3-52 b). Die verbleibenden Isolate Ab35, Ab38, Ab33 und Ab34 wurden mit den Primerpaaren OXA-23 multi und OXA-24 multi auf das Vorhandensein von Varianten der Gruppe V-Untergruppen 1 (*bla*_{OXA-24}-ähnlich) und 2 (*bla*_{OXA-23}-ähnlich) untersucht (siehe Abbildung 3-53 a). Bei Ab33 konnte ein Gen der Untergruppe 1 nachgewiesen werden, bei Ab34 ein Gen der Untergruppe 2. Zur Produktion der markierten Ziel-DNA für die Hybridisierung wurden anschließend die in dieser Arbeit entwickelten Primerpaare OXA-23 und OXA-24 verwendet (siehe Abbildung 3-53 b). Bei den verbleibenden Isolaten Ab35 und Ab38 wurde mit Hilfe des Primerpaares OXA-58 multi *bla*_{OXA-58} nachgewiesen (siehe Abbildung 3-54). Die durchschnittliche Einbauraten der markierten PCR-Produkte betrug 238 NT/Cy-3.

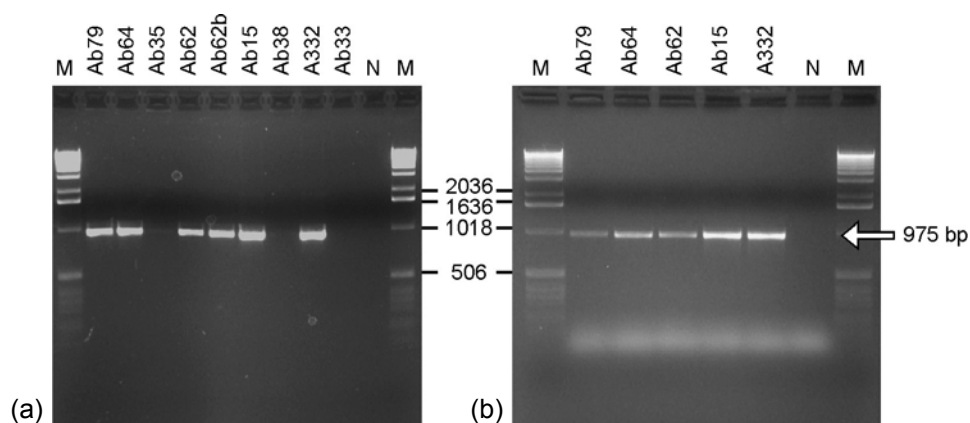


Abbildung 3-52: (a) PCR Screening mit Primern OXA-69 forw und OXA-69 rev (siehe Tabelle 2-1). (b) Markierungs-PCR positiver Isolate mit Primerpaar OXA-69. M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle.

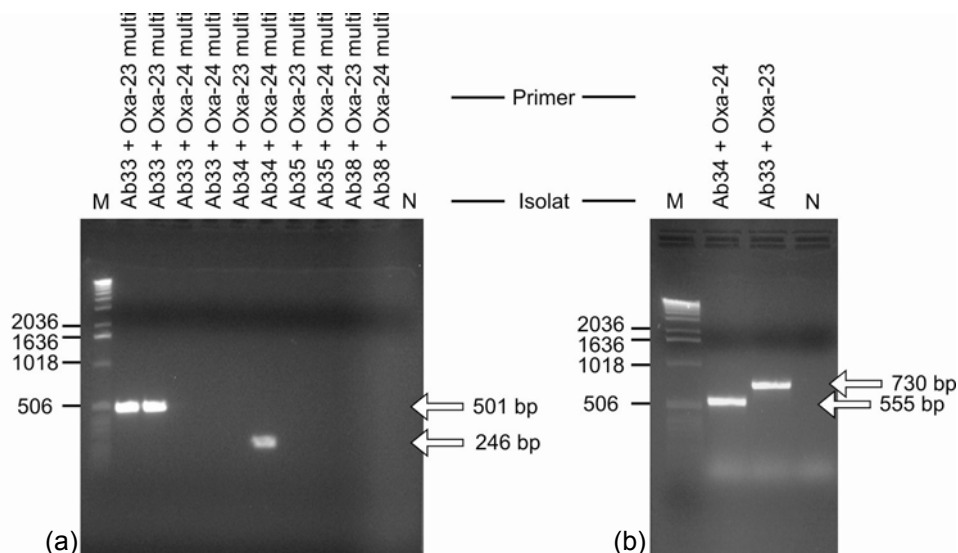


Abbildung 3-53: (a) PCR Screening mit Primerpaaren OXA-23 multi und OXA-24 multi (siehe Tabelle 2-1). (b) Ab33 und Ab34 Markierungs-PCR mit Primerpaaren OXA-23 und OXA-24. M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle.

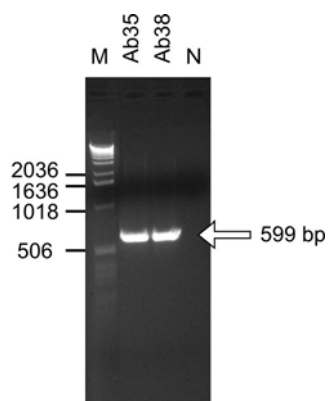


Abbildung 3-54: PCR Screening von Ab35 und Ab38 mit Primerpaar OXA 58 multi (siehe Tabelle 2-1). M, DNA-Längenstandard; N, Negativkontrolle.

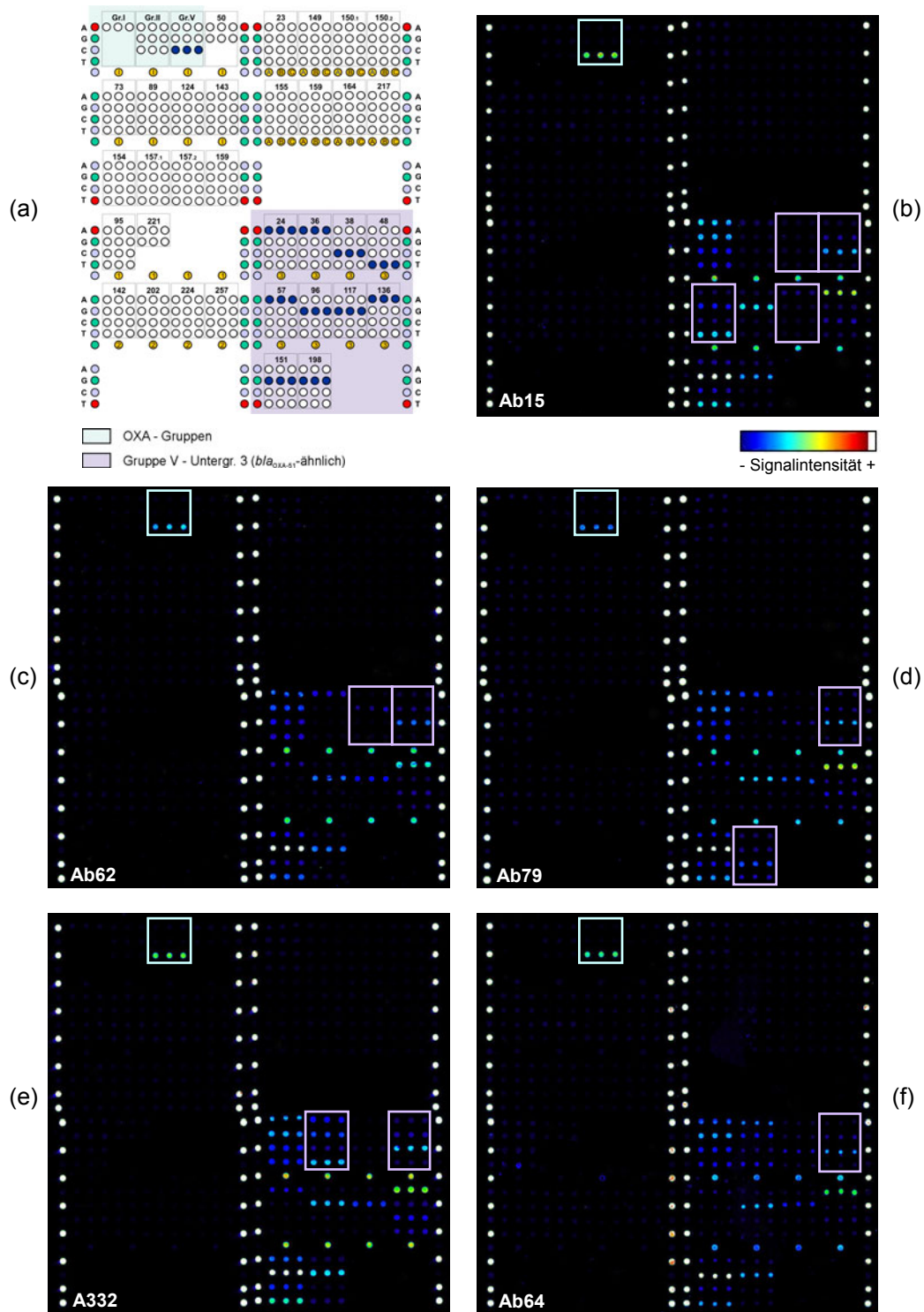


Abbildung 3-55: (a) Layout des OXA-Chips. Der für die Untergruppe 3 der Gruppe V spezifische Bereich des Microarrays ist farbig markiert. Die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit OXA-51 sind dunkelblau hervorgehoben. Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit 200 ng markierter Ziel-DNA von (b) OXA-69 (Ab15, Tecan-Scanner-PMT: 170 %), (c) OXA-62 (Ab62, PMT: 160 %), (d) OXA-70 (Ab79, PMT: 170 %), (e) OXA-66 (A332, PMT: 160 %) und (f) OXA-65 (Ab64, PMT: 170 %). Sondensätze für die Gruppenidentifizierung und die Identifikation der jeweiligen Variante sind ebenfalls markiert.

Nach der unspezifischen Fragmentierung der Ziel-DNA mit DNase wurden die markierten PCR-Produkte mit Hilfe des Microarrays analysiert. Schon bei der Konzeption des OXA-Arrays wurden für das Sondendesign Parameter vorgegeben, die eine spätere Integration des Arrays als OXA-Chipmodul in einen größeren Microarray (den ESBL-Chip) zulassen. Für die Hybridisierung konnten daher analoge Hybridisierungsbedingungen (47 °C, 2x SSPE, 0,01 % SDS) verwendet werden. Aufgrund der im Vergleich schwachen Markierung der Ziel-DNA (siehe Kapitel 3.1.5.1) wurden 200 ng Ziel-DNA eingesetzt. Da keine Hybridisierungsstation zur Verfügung stand, wurde für zwei Stunden manuell hybridisiert (siehe 2.2.7). Abbildung 3-55 zeigt Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit Ziel-DNA der detektierten Vertreter der Untergruppe 3 der Gruppe V, Abbildung 3-56 die Microarrayanalyse der *bla*_{OXA}-Gene der Untergruppen 1 und 2. Die für die Gruppenidentifizierung bzw. Identifikation der jeweiligen Variante relevanten Sondensätze sind markiert.

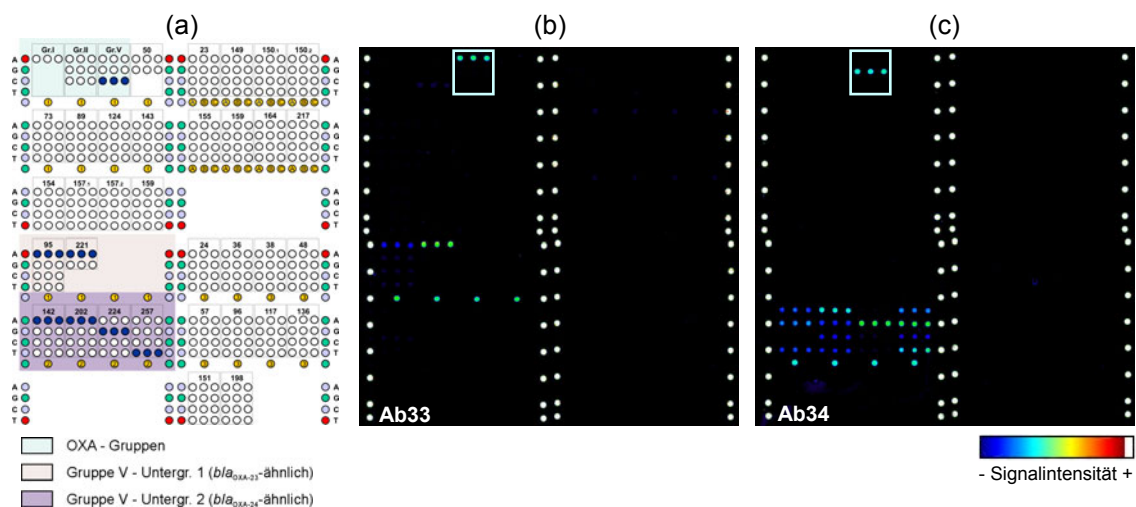


Abbildung 3-56: (a) Layout des OXA-Chips. Die für die Untergruppen 1 und 2 der Gruppe V spezifischen Bereiche des Microarrays sind farblich markiert. Die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit OXA-23 bzw. OXA-24 sind dunkelblau hervorgehoben. Fluoreszenzbilder nach Hybridisierung mit 200 ng markierter Ziel-DNA von (b) OXA-23 (Ab33, Tecan-Scanner-PMT: 140 %) und (c) OXA-24 (Ab34, PMT: 145 %).

Die Ergebnisse der Datenauswertung dieser Experimente sind in Abbildung 3-57, Abbildung 3-58, Abbildung 3-59 und Abbildung 3-60 dargestellt. Bei der Auswertung der Sondensätze zur Identifikation der Gruppen- bzw. Untergruppenzugehörigkeit wurden relative Intensitäten (RI) berechnet (Abbildung 3-57). Hierzu wurden die Signalintensitäten (I) der verschiedenen Gruppensonden jeweils auf das höchste Signal aller Gruppensonden bezogen. Die hybridisierten OXA-Gene der Gruppe V konnten eindeutig dieser Gruppe und den verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden. Mit relativen Intensitäten aller nicht korrekten Sonden unter 10 % ($RI_{MM} < 0,1$) der jeweils korrekten Gruppensonde war die Identifikation dabei hoch spezifisch. Abbildung 3-58 zeigt die absoluten Signalintensitäten aller Sonden des Chips exemplarisch für die Probe Ab79. In Abbildung 3-59 sind die relativen Signalintensitäten und deren Standardabweichungen der für die Untergruppe 3 spezifischen Sondensätze dargestellt. Die amplifizierten *bla*_{OXA}-Gene führten zu unterschiedlichen Signalmustern. Ab79 wurde z. B. aufgrund der Signale der Sondensätze OXA 3.48 und OXA 3.198 identifiziert (Abbildung 3-55 d). Die durch das höchste Signal der C-Sonde von OXA 3.198 identifizierte Mutation, welche für den Aminosäure-Austausch Asp198His verantwortlich ist, ist nur für OXA-70 bekannt (Evans et al. 2008). Abbildung 3-60 fasst die Auswertung der für die Untergruppen 1 und 2 spezifischen Sondensätze zusammen.

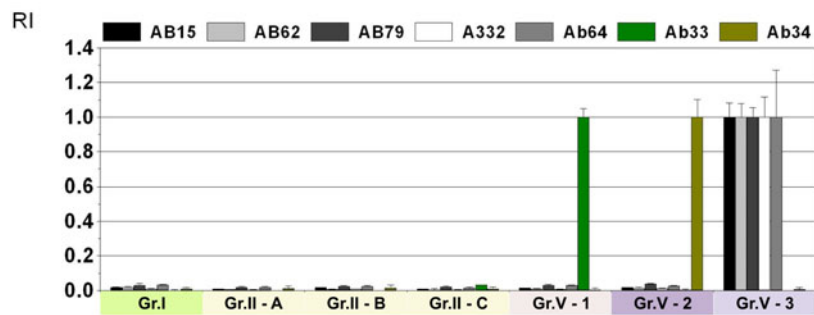


Abbildung 3-57: Quantitative Auswertung der verschiedenen Gruppen-spezifischen Sonden. Relative Signalintensitäten (RI) nach Hybridisierung mit Vertretern verschiedener Untergruppen der Gruppe V. Für die Darstellung wurde ein *Cut-Off* von 300 Intensitätseinheiten verwendet.

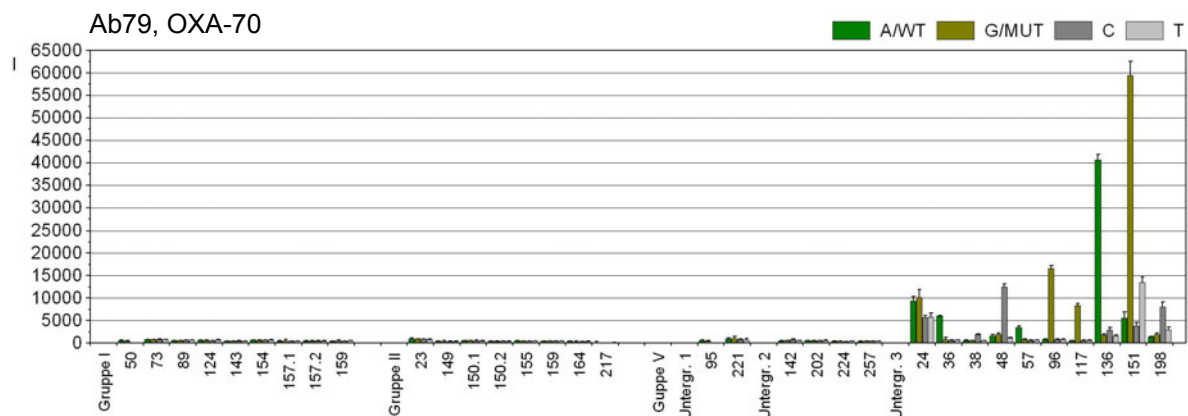


Abbildung 3-58: Quantitative Auswertung der in Abbildung 3-55 d gezeigten Hybridisierung. Signalintensitäten (I) aller Sonden nach Hybridisierung mit 200 ng markierter Ziel-DNA von OXA-70 (Ab79, 199 NT/F, n = 6). Es wurde ein *Cut-off* von 300 Intensitätseinheiten verwendet.

Tabelle 3-12: OXA-Chip Ergebnisse

Gruppe 5	Isolatname	OXA-Chip Ergebnis	Identität*	Übereinstimmung
Untergruppe 1	Ab33	OXA-23	OXA-23	Ja
Untergruppe 2	Ab34	OXA-24	OXA-24	Ja
Untergruppe 3	Ab15	OXA-69	OXA-69	Ja
Untergruppe 3	Ab64	OXA-65	OXA-65	Ja
Untergruppe 3	A332	OXA-66 oder OXA-76	OXA-66	Ja
Untergruppe 3	Ab79	OXA-70	OXA-70	Ja
Untergruppe 3	Ab62	OXA-64	OXA-64	Ja
Untergruppe 4**	Ab35	- (PCR)	OXA-58	Ja
Untergruppe 4**	Ab38	- (PCR)	OXA-58	Ja

*Mitteilung durch Dr. Hamouda; die Identifizierung wurde, in der Arbeitsgruppe Molekulare Chemotherapie des Zentrum für Infektionskrankheiten in Edinburgh, durch Sequenzierung des OXA-Gens durchgeführt.

**Untergruppe 4 (OXA-58) wurde mittels PCR korrekt identifiziert (siehe Abbildung 3-54).

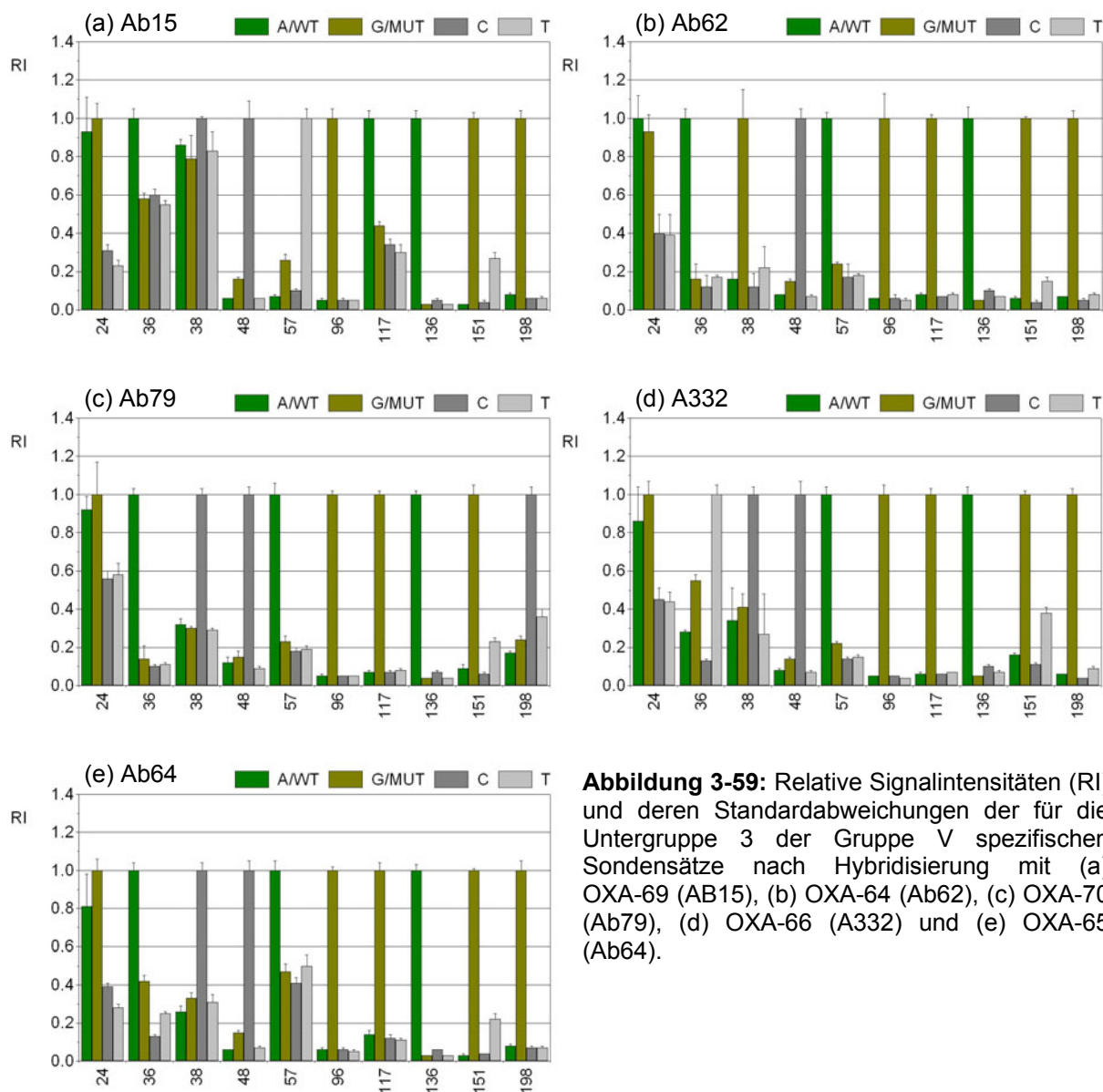


Abbildung 3-59: Relative Signalintensitäten (RI) und deren Standardabweichungen der für die Untergruppe 3 der Gruppe V spezifischen SONDENSÄTZE nach Hybridisierung mit (a) OXA-69 (AB15), (b) OXA-64 (Ab62), (c) OXA-70 (Ab79), (d) OXA-66 (A332) und (e) OXA-65 (Ab64).

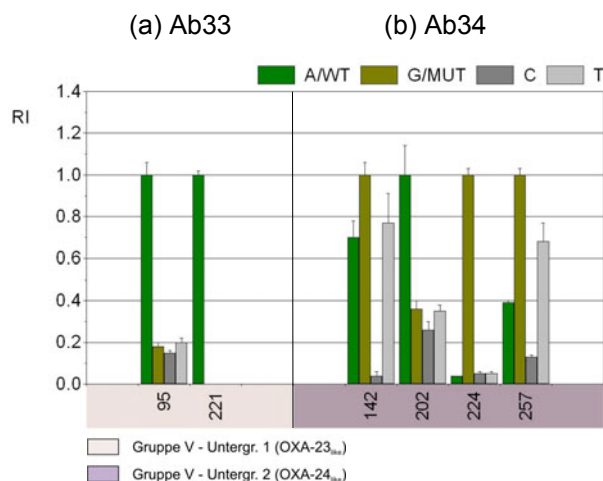


Abbildung 3-60: Relative Signalintensitäten (RI) und deren Standardabweichungen der für die Untergruppen 1 und 2 der Gruppe V spezifischen SONDENSÄTZE nach Hybridisierung mit (a) OXA-23 (AB33) und (b) OXA-24 (Ab34).

Die Ergebnisse der Chip-Analyse stimmten in allen Fällen mit der zuvor durch Sequenzierung bestimmten Identität der Varianten überein (Tabelle 3-12). Zwischen OXA-66 und OXA-76 (A332) konnte mit dem aktuellen Sondensatz nicht unterschieden werden. Die beiden OXA-58 wurden nicht mit Hilfe des Microarrays analysiert, da die Identifikation mit dem PCR-Nachweis einer Untergruppe 4-Gens vollständig ist und der aktuelle Sondensatz keine Sonden zur Detektion dieser Untergruppe beinhaltet.

3.3.2 Analyse der Sondensätze

Folgende 5 der 10 für Untergruppe 3 spezifischen Sondensätze zeigten optimale Eigenschaften bezüglich Signalintensität und Diskriminierung: OXA 3.48, OXA 3.96, OXA 3.136, OXA 3.151 und OXA 3.198. Die Sondensätze OXA 3.36, OXA 3.38, OXA 3.57 und OXA 3.117 zeigten teilweise Signalintensitäten der jeweiligen Perfect Match-Sonden unter 2000 Intensitätseinheiten. Niedrige Signalintensitäten korrelierten in allen Fällen mit einer Verringerung des Diskriminierungsvermögens und konnten für die Sondensätze OXA 3.36, OXA 3.38, OXA 3.57 auf bekannte Fehlpaarungen der Sonden mit der hybridisierten *bla*_{OXA}-Ziel-DNA zurückgeführt werden (siehe Spezifitäten der Sondensätze in (Henn 2006)). Der Sondensatz OXA 3.24 zeigte ein ungenügendes Diskriminierungsvermögen. Die beobachteten Eigenschaften der 5 Sondensätze OXA 3.24, OXA 3.36, OXA 3.38, OXA 3.57 und OXA 3.117 werden im Folgenden beschrieben:

(1) Die G-Sonde des Sondensatzes OXA 3.24 zeigte Signalintensitäten in der gleichen Größenordnung wie die perfekt komplementäre A-Sonde. Dies führte in 4 von 5 Fällen zu einer falschen Identifizierung (Abbildung 3-59 a, c - e). Dieses Verhalten konnte nicht mit thermodynamischen Daten oder Fehlpaarungen korreliert werden. Einige *bla*_{OXA}-Varianten (OXA-68, OXA-77, OXA 78, OXA-89, OXA-91 und OXA-98) besitzen an der entsprechende Stelle eine Mutation zu T. Es ist jedoch keine Variante bekannt, die eine Mutation zu G besitzt. Zur Identifikation wurde daher in allen 5 Fällen das Signal der A-Sonde als höchstes Signal gewertet.

(2) Bei Hybridisierungen mit *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-65}, *bla*_{OXA-69} und *bla*_{OXA-70} zeigte die korrekte A-Sonde des Sondensatzes OXA 3.36 die größten Signalintensitäten. Der Sondensatz besitzt eine Fehlpaarung zu *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-69} und *bla*_{OXA-70}-Ziel-DNA. Er zeigte jedoch nur nach Hybridisierung mit *bla*_{OXA-69} einen zu niedrigen I_{PM} -Wert von 1137 und RI_{MM} -Werte $> 0,5$ (0,55-0,6) (Abbildung 3-59 a). Bei Hybridisierungen mit *bla*_{OXA-66} Ziel-DNA wurde das entsprechende Nukleotid korrekt als T identifiziert. Die G-Sonde zeigte dabei jedoch einen RI_{MM} -Wert von 0,55 (Abbildung 3-59 d).

(3) Der Sondensatz OXA 3.38 besitzt Fehlpaarungen zu *bla*_{OXA-69}, *bla*_{OXA-66} und *bla*_{OXA-70}. Hybridisierungen mit Ziel-DNA dieser drei Gene führte zu Signalintensitäten der C-Sonde < 2000 Intensitätseinheiten ($I_{PM} = 692; 900$ bzw. 1912). Die Signalstärke korrelierte dabei direkt mit dem Diskriminierungsvermögen. Während der Sondensatz nach Hybridisierung mit OXA-70 optimale und nach Hybridisierung mit OXA-66 noch akzeptable Eigenschaften zeigte (RI_{MM} der G-Sonde = 0,41), führten die sehr niedrigen Signalintensitäten nach Hybridisierung mit OXA-69 zu RI_{MM} -Werten von 0,79 - 0,83 (Abbildung 3-59 c, d und a).

(4) Die perfekt komplementäre A-Sonde von OXA 3.57 zeigte bei der Hybridisierung mit *bla*_{OXA-65}-Ziel-DNA einen I_{PM} -Wert von ca. 1500. Der Sondensatz zeigte trotzdem ein akzeptables Diskriminierungsvermögen mit RI_{MM} -Werten der G-Sonde und T-Sonde von 0,47 bzw. 0,50 (Abbildung 3-59 e). In weiteren Hybridisierungen zeigte OXA 3.57 optimale Eigenschaften.

(5) Die perfekt komplementäre A-Sonde von OXA 3.117 zeigte bei der Hybridisierung mit *bla*_{OXA-69}-Ziel-DNA einen I_{PM} -Wert von ca. 1600. Der Sondensatz zeigte trotzdem ein akzeptables Diskriminierungsvermögen mit dem größten RI_{MM} -Wert der G-Sonde von 0,44

(Abbildung 3-59 a). Die weiteren bla_{OXA} -Varianten waren zur G-Sonde perfekt komplementär. In diesen Hybridisierungen verfügte OXA 3.117 über optimale Eigenschaften (Abbildung 3-59 b - e).

Für den Sondensatz OXA 3.24 sollte ein Redesign zur Verbesserung der Diskriminierung durchgeführt werden. Ein theoretischer Sondensatz mit nur 2 Sonden des aktuellen Sondensatzes (WT = A und MUT = T) hatte aber bereits eine akzeptable Diskriminierung. Durch die Ignorierung des Signals der G-Sonde dieses Sondensatzes konnten alle Positionen und somit die hybridisierten bla_{OXA} -Gene der Gruppe V Untergruppe 3 korrekt identifiziert werden (Tabelle 3-12). Da jedoch niedrige Signalintensitäten einiger Sonden mit einer Verringerung des Diskriminierungsvermögens korrelierten, sollte für die Sondensätze OXA 3.36, OXA 3.38, OXA 3.57 und OXA 3.117 ein Redesign mit dem Ziel höherer Signalintensitäten durchgeführt werden. Aufgrund der komplexen Situation der Sonden von OXA 3.36, OXA 3.38 und OXA 3.57 (Fehlpaarungen zu einzelnen Varianten) waren die teilweise schwachen Signale dieser Sondensätze jedoch erwartet worden. Für ein Redesign bleiben daher nur wenige Optionen. Trotzdem zeigten die Sondensätze OXA 3.57 und OXA 3.117 in allen Hybridisierungen ein akzeptables Diskriminierungsvermögen (RI_{MM} -Werte $< 0,5$). Die Sondensätze OXA 3.36 und OXA 3.38 zumindest in 4 von 5 Fällen RI_{MM} -Werte von maximal 0,55.

Abbildung 3-60 fasst die Auswertung der jeweils spezifischen Sondensätze für die in Ab33 und Ab34 nachgewiesenen bla_{OXA} -Gene der Untergruppen 1 und 2 zusammen. Die detektierten Gene konnten korrekterweise als OXA-23 (Ab33) und OXA-24 (Ab34) identifiziert werden (Tabelle 3-12). Alle Sondensätze zeigten ausreichende Signalintensitäten. Beide Sondensätze der Untergruppe 1 zeigten ein sehr gutes Diskriminierungsvermögen (alle RI_{MM} -Werte $< 0,2$). Unter den Sondensätzen der Untergruppe 2 war die Leistungsfähigkeit der Sondensätze OXA 2.202 und OXA 2.224 optimal. Die Sondensätze OXA 2.142 und OXA 2.257 zeigten jedoch ein ähnliches Verhalten wie der Sondensatz OXA 3.24 (siehe 1.). Die hohen Signale der G- und T-Sonde von OXA 2.142 und der G-Sonde von OXA 2.257 können durch keine bekannten Varianten verursacht werden und wurden als Mismatch-Signale gewertet. Für die Sondensätze OXA 2.142 und OXA 2.257 sollte daher ein Redesign zur Verbesserung der Diskriminierung durchgeführt werden. Die theoretischen Sondensätze mit nur jeweils 2 Sonden des aktuellen Sondensatzes (OXA 2.142: WT = A und MUT = C; OXA 2.257: WT = T und MUT = A) zeigten gute Diskriminierungen und führten zur korrekten Identifizierungen von OXA-24.

Nach der Hybridisierung mit markierter Ziel-DNA von bla_{OXA} -Genen der verschiedenen Untergruppen der Gruppe V konnten keine relevanten Kreuzhybridisierungs-Signale ($I > 500$) der für die Gruppe I und II spezifischen Sondensätze festgestellt werden. Auch die Sondensätze der jeweils anderen Untergruppen zeigten keine Kreuzreaktivitäten.

Fazit: Durch die Testung des Microarrays zur Genotypisierung von OXA β -Lactamasen mit sieben bla_{OXA} -Genvarianten der Gruppe V (Carbapenemasen) wurde die grundsätzliche Evaluierung des aktuellen Sondensatzes dieses Chips komplettiert. Für die Amplifikation und Markierung von bla_{OXA} -Genen der Gruppe V Untergruppen wurden eine Reihe von PCR-Protokollen etabliert. Alle Varianten konnten korrekt identifiziert und spezifisch der Gruppe V und den verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden. Niedrige Signale einzelner Sondensätze basierten meist auf Mismatches zu einzelnen Varianten und waren aufgrund eines besonders niedrigen Hintergrundsignals problemlos auswertbar. Optimierungsbedarf besteht lediglich bei den Sondensätzen OXA 3.24, OXA 2.142 und OXA 2.257.

4. Diskussion

Die Zunahme nosokomialer und ambulanter Infektionen, die durch Antibiotika-resistente Bakterien verursacht werden, entwickelt sich zunehmend zu einem der ernsthaftesten Probleme der Humanmedizin. ESBL-produzierende gramnegative Infektionserreger und Organismen, die weitere β -Lactamasen mit einem breiten Wirkspektrum produzieren, werden immer häufiger nachgewiesen und verursachen eine Vielzahl von Problemen in der Therapie, Infektionskontrolle und Krankenhaushygiene. Der verfehlte oder verspätete ESBL-Nachweis ist mit einer Reihe negativer therapeutischer und wirtschaftlicher Folgen assoziiert (Melzer und Petersen 2007; Schwaber et al. 2006; Schwaber und Carmeli 2007). Eine schnelle, sichere und eindeutige Information bezüglich der Resistenz eines Erregers ist daher essentiell für eine prospektive Antibiotika-Therapie und den therapeutischen Erfolg. Eine falsche empirische Therapie führt nicht nur zu einer verspäteten Einleitung einer adäquaten Therapie, sondern fördert auch die Verbreitung von Resistenzen aufgrund eines erhöhten Selektionsdrucks (Singer et al. 2003). Phänotypische Methoden werden den Anforderungen im Bereich der ESBL-Detektion oft nicht gerecht. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer genotypischen Methode, die einen schnellen Nachweis und eine eindeutige Identifikation von mehreren ESBL-assoziierten Resistenzgenen erlaubt. Hierfür wurde ein integrierter diagnostischer DNA-Microarray für die gleichzeitige Genotypisierung der drei häufigsten β -Lactamase-Genfamilien, bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M} , entwickelt und mit klinischen Proben validiert. Für eine spätere Erweiterung dieses als ESBL-Chip bezeichneten, Microarrays, wurden zwei weitere Chipmodule für plasmidkodierte AmpC- und verschiedene OXA- β -Lactamasen entwickelt, etabliert und validiert. Diese werden den Informationsgehalt des Verfahrens in Zukunft deutlich erhöhen und erlauben die phänotypisch sehr schwierige Abgrenzung von klassischer ESBL-assoziierte Resistenz und Resistenz, die durch schlecht hemmbare Klasse C (AmpC) oder D (OXA) Enzyme vermittelt wird.

4.1. Genotypischer Nachweis von Resistenz

Kulturbasierte phänotypische Methoden sind die Standardverfahren zur Resistenztestung in der klinischen Diagnostik. Sie sind einfach durchzuführen und kosteneffektiv. Dabei können sie für eine große Bandbreite an Mikroorganismen und Resistenzmechanismen eingesetzt werden und testen direkt die In-vitro-Empfindlichkeit eines Erregers gegen ein häufig verwendetes Antibiotikum. Diese Eigenschaft ist jedoch gleichzeitig die größte Schwäche phänotypischer Methoden, denn die fehlende Spezifität bei der Identifikation des ursächlichen Resistenzmechanismus kann einerseits zu falschen Interpretationen der tatsächlich gemessenen Empfindlichkeiten führen und macht andererseits eine Überwachung aufkommender und sich ausbreitender Resistenzen schwierig. Dieses Dilemma wird besonders deutlich beim Nachweis von Resistenz gegenüber β -Lactamen mit breitem Wirkspektrum. Der phänotypische Nachweis ESBL-produzierender Keime und deren Abgrenzung von anderen Resistenzmechanismen sind zu aufwändigen diagnostischen Herausforderungen geworden und etablierte Verfahren stehen dabei folgenden Problemen gegenüber: Erstens kann nicht jede ESBL mit routinemäßigen Empfindlichkeitstests nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür sind die sehr heterogenen Substrataffinitäten der inzwischen immensen Zahl an Enzymen und Enzymvarianten. Wenn man Standard CLSI-Grenzwerte verwendet, sind bis zu 40 % aller ESBL-produzierenden Erreger mindestens gegen ein Oxyimino-Cephalosporin empfindlich (Paterson und Bonomo 2005). Dies führte dazu, dass in einer europäischen Studie bis zu 33 % aller ESBL-produzierenden Erreger nicht detektiert wurden (Livermore und Yuan 1996). Auch in anderen Studien des ICARE-Projekts (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*) oder der WHO wurden ESBL-produzierende Erreger nicht korrekt gemeldet (Steward et al. 2000; Tenover et al.

2001). Zweitens können ein niedriges Expressionsniveau des Resistenz-vermittelnden Enzyms, der Inoculum-Effekt und/oder die Pharmakokinetik/Pharmakodynamik bestimmter Cephalosporine dafür verantwortlich sein, dass in vitro MHK-Werte ermittelt werden, die nach den jeweiligen Richtlinien (z. B. CLSI) als „sensibel“ bewertet werden, während gleichzeitig am Infektionsort eine ausgeprägte Resistenz besteht (Andes und Craig 2005; Thomson und Moland 2001). Drittens verzögert das auf der CLSI-Richtlinie basierende zweistufige Verfahren das Testresultat, so dass von der Probenahme bis zur Bestätigung 2 bis 3 Tage vergehen können. Halbautomatisierte Systeme wie das VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich), MicroScan (Dade MicroScan, West Sacramento, USA) oder Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) System tragen zur Optimierung von Arbeitsabläufen und Kosteneffizienz in klinischen Mikrobiologie-Laboren bei, benötigen jedoch nach der Isolation des Erregers weiterhin 9 bis 11 Stunden für die Analyse (Donay et al. 2004; Linscott und Brown 2005; Sanders et al. 2000; Sanders et al. 2001). Weitere Probleme entstehen durch die auf Synergismus basierenden Bestätigungstests. So sind z. B. die ESBL-E-Test-Ergebnisse schwierig zu interpretieren. Eine Studie bezifferte die Häufigkeit solcher Fehlinterpretationen auf ca. 30 % der Fälle (Leverstein-van Hall et al. 2002). Außerdem können Synergieeffekte beispielsweise durch die Koexistenz weiterer β -Lactamasen, die kaum von Inhibitoren gehemmt werden (IRTs, AmpCs, Metallo-Lactamasen usw.), maskiert sein. Für jede weitere phänotypische Analyse zur Eingrenzung des Resistenzmechanismus (Abbildung 1-3) muss der Erreger erneut kultiviert werden.

Verschiedene Standardtests (DDST und CDM) und halbautomatische Systeme (Phoenix, VITEK 2 und Microscan) wurden kürzlich von Wiegand und Kollegen verglichen und zeigten unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten (Wiegand et al. 2007). Insgesamt wurden Sensitivitäten zwischen 83,5 % (Microscan) und 98,9 % (Phoenix) erreicht. Die Spezifitäten zeigten mit Werten zwischen 52,2 % (Phoenix) und 96,6 % (CDM) eine größere Streuung. Auffällig waren die niedrigen Spezifitäten der halbautomatischen Systeme bei der Testung von Spezies mit induzierbaren *ampC*-Genen (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*; < 40).

Werden auf der Basis falsch interpretierter Empfindlichkeitstestungen Therapieentscheidungen getroffen, kann es zu Therapiefehlern kommen. Ein verfehlter oder verspäteter ESBL-Nachweis führt in der Regel zu einer Verzögerung der Einleitung einer adäquaten antibiotischen Therapie und in der Folge zu höheren Mortalitätsraten, verlängerten Patientenliegezeiten und höheren Kosten (siehe 1.5).

Die kulturunabhängige molekularbiologische Analyse von resistenten Keimen ist hinsichtlich Geschwindigkeit, Verlässlichkeit und Informationsgehalt eine vielversprechende Alternative zur klassischen phänotypischen Resistenztestung. Sie wird bereit jetzt retrospektiv zur Klärung uneindeutiger Empfindlichkeitstests verwendet, hat aber auch ein großes Potential zur Vorhersage von potentiellen Resistenzen. Die Vorteile eines genotypischen Resistenznachweises sind: (I) Genotypische Methoden besitzen ein großes Potential zur Beschleunigung der Erregerdiagnostik. Die für die Testung notwendige DNA-Spezies kann im optimalen Fall direkt aus der klinischen Probe gewonnen und analysiert werden. Eine Isolation und Anzucht des ursächlichen Keims ist dann nicht nötig. Dadurch wird zusätzlich die bereits große Bandbreite an Mikroorganismen, die analysiert werden kann, um langsam wachsende oder sogar unkultivierbare Mikroorganismen erweitert. (II) Die Detektion und Identifikation von Resistenzgenen ist unabhängig vom Expressionsniveau. Dadurch spielen Störfaktoren, wie z. B. ein niedriges Genexpressionsniveau, Inoculum-Effekt, induzierbare *bla*-Gene oder Überexpression von nicht-ESBLs, die zu schwer interpretierbaren Antibiotogrammen führen, keine Rolle. Auch die Maskierung von Synergie-Effekten durch die gleichzeitige Expression einer weiteren β -Lactamase ist ohne Einfluss. Optimalerweise werden mehrere *bla*-Gene mit Hilfe der gewählten Methode genotypisiert. (III) Die Interpretation von genotypischen Daten ist weniger subjektiv und eine Fehlinterpretation unwahrscheinlicher. Auch die Kontaktzeit zwischen Laborpersonal und intaktem Infektionserreger ist kürzer. (IV) Moderne Genotypisierungsmethoden besitzen gute Multiplexingkapazitäten und liefern eine Vielzahl genetischer Informationen in einem einzigen

Experiment. Mit Hilfe des hohen Informationsgehalts einer solchen Methode können, abgesehen von einer umfangreichen Resistenztestung, wichtige epidemiologische Daten erhoben werden.

Allerdings gibt es auch Nachteile, die den Einsatz kulturunabhängiger Genotypisierungsmethoden einschränken: (I) Wenn in einer klinischen Probe nur sehr wenige Zellen eines Infektionserregers in einem größeren Volumen vorhanden sind, könnten die DNA-Isolation und die anschließende Testung zu wenig sensitiv sein. Hier könnten Aufkonzentrierungsmethoden hilfreich sein. So kann z. B. mit Hilfe des LOOXTER-Aufreinigungskits selektiv bakterielle DNA angereichert werden (SIRS-Lab, Jena, Deutschland). (II) Weitere Probleme ergeben sich, wenn in einer klinischen Probe DNA-Mischungen von verschiedenen Spezies vorhanden sind. Dabei kann es sich um Mischungen verschiedener Erreger, aber auch um Erreger und weitere nicht pathogene Organismen handeln. Des Weiteren entsteht diese Situation bei einer Kontamination der Probe vor der DNA-Isolation. In diesen Fällen ist es nötig, ein nachgewiesenes Resistenzgen einer Spezies zuzuordnen. Ansätze, die eine Spezies-spezifische Anreicherung zulassen, können hier hilfreich sein. Hierfür wurden z. B. Verfahren beschrieben, die die Spezifitäten von Antikörpern (Boyaci et al. 2005; Dudak et al. 2009) oder RNA Polynukleotidsonden (Zwirgmaier et al. 2003; Zwirgmaier et al. 2004a; Zwirgmaier et al. 2004b) nutzen. (III) Bestimmte Resistenzproblematiken können von einer Vielzahl von Resistenzgenen und Polymorphismen vermittelt werden. Der Entwurf einer umfassenden Genotypisierungsmethode kann daher schnell sehr komplex werden und stellt hohe Ansprüche an die Multiplexingkapazitäten eines Verfahrens. (IV) Mit Ausnahme von gesamtgenomischen Sequenzierungsverfahren sind die meisten Methoden nur in der Lage, bekannte Resistenzgene oder genetische Merkmale der Ziel-Gene nachzuweisen. Neue *Targets* müssen anschließend implementiert werden. Für manche Resistenzmechanismen sind die genauen genetischen Ursachen noch nicht bekannt. (V) Die Unabhängigkeit der Detektion vom Genexpressionsniveau kann auch ein Nachteil sein, da manchmal erst durch Überexpression oder Deregulierung der Genexpression klinische Resistenz entsteht, während bei niedriger Expression Empfindlichkeit vorliegt. Ein detektiertes Gen muss nicht zwangsläufig exprimiert werden. (VI) Es existieren kaum klinische Standards für die molekularbiologische Analyse, und klinische Studien, die den Nutzen, die Genauigkeit, Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Methoden untersuchen sind noch selten. (VII) Im Vergleich zu einfachen phänotypischen Tests sind molekularbiologische Verfahren meist teurer. Dieser Nachteil kann jedoch schnell aufgehoben werden, wenn die teurere Methode bessere Eigenschaften (Geschwindigkeit, Sensitivität, Spezifität) zeigt. Eine schnellere Einleitung einer adäquaten Therapie spart neben den positiven Effekten für den Patient letztendlich Kosten (Marra et al. 2006).

Für den Nachweis und die Analyse von Resistenzgenen wurden viele molekularbiologische Verfahren beschrieben. In Anbetracht der Tatsache, dass eine aussagekräftige genotypische Resistenztestung hohe Ansprüche an die Multiplexingkapazität einer Methode stellt, müssen diese Verfahren, neben weiteren Eigenschaften (Sensitivität, Spezifität, Geschwindigkeit, Kosten usw.), vor allem unter diesem Aspekt betrachtet werden. Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung der sehr großen Anzahl (klinisch relevanter) Polymorphismen der in dieser Arbeit untersuchten *bla*-Gene (siehe 1.2).

Für die Charakterisierung der β -Lactam-Resistenzgene *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} wurden unter anderem eine Reihe klassischer molekularbiologischer Methoden entwickelt, darunter Southern-Blots, Koloniehybridisierung, PCR-SSCP, PCR-RFLP oder einer Kombination aus PCR-SSCP und PCR-RFLP (siehe 1.5.2). Diese Methoden lassen jedoch die geforderte Multiplexingkapazität vermissen. SSCP- und RFLP-Methoden benötigen elektrophoretische Analysen der entstandenen Produkte. Die Auflösung solcher Verfahren ist begrenzt, so dass diese über nicht ausreichende Spezifitäten zur Unterscheidung einer Vielzahl an Genvarianten verfügen. Ein großer Nachteil von RFLP-Methoden ist die Tatsache, dass nicht alle bekannten Polymorphismen Restriktionsstellen beeinflussen.

PCR-Methoden wie die Real-time PCR (gekoppelt mit einer Schmelzkurvenanalyse) oder die Ligations-vermittelte PCR (LDR-PCR) haben deutlich bessere Sensitivitäten und Spezifitäten und sind meist schneller. So konnten Niederhauser und Kollegen eine Punktmutation im Hintergrund von 100,000 Wildtyp-Bakterien nachweisen (Niederhauser et al. 2000). Die Multiplexingkapazitäten einiger Real-time PCR-Systeme sind in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Daher ist diese Technologie interessant für die Untersuchung einzelner Punktmutationen oder den Nachweis einiger *bla*-Genfamilien. Für die Analyse der extrem diversen β -Lactam-Resistenzgene sind jedoch beide PCR-Methoden in der aktuellen Form nicht geeignet.

Der Goldstandard zur Charakterisierung bzw. Identifizierung von Resistenzgenen ist daher weiterhin die Sequenzierung. Ein Vorteil von Sequenzierungsverfahren ist, dass durch die Generierung von Sequenzinformationen auch zuvor unbekannte Polymorphismen detektiert werden können. In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer Sequenzieretechnologien entwickelt, wie z. B. das Genome Sequencer FLX System von 454/Roche, Systeme von Illumina (Genome Analyzer), ABI (SOLiD) oder jüngere Verfahren wie von Pacific Bioscience (SMRT), die die Geschwindigkeit und Wirtschaftlichkeit dieser Verfahren verbesserten und für Anwendungen wie die Pathogendetektion, aber auch die Genotypisierung interessanter machen. In Zukunft könnten auch Verfahren, die Sequenzieretechnologien mit etablierteren Technologien wie DNA-Microarrays kombinieren, zu kosteneffizienteren Verfahren führen (z. B. NimbleGen (Sequence Capture), Febit (Hybselect) oder Agilent (SureSelect)). Diese Verfahren nutzen die Arraytechnologie zur spezifischen Anreicherung bestimmter Sequenzbereiche vor der Sequenzierung. Aktuell stehen diese Verfahren jedoch nicht für eine schnelle Resistenztestung in der klinischen Routine zur Verfügung, da die nötige technische Ausstattung sehr teuer ist und Arbeitsabläufe, die eine zentrale Analyse in ausgestatteten Referenzlaboren vorsehen, zu lange benötigen. Auch Massenspektrometerbasierte Methoden, wie z. B. das von Stürenburg und Kollegen entwickelten Verfahren zur Analyse von *bla*_{SHV} (Stürenburg et al. 2006) sind noch nicht in der klinischen Routine angekommen. Hier stellt sich auch erneut die Frage nach der Multiplexingkapazität, da einzelne *bla*-Gene getrennt vorbereitet und nacheinander analysiert werden müssen.

Aufgrund der Anpassungsprobleme der beschriebenen Verfahren an die Herausforderungen der Genotypisierung der extrem diversen β -Lactam-Resistenzgene, stellen DNA-Microarrays eine viel versprechende Genotypisierungsplattform dar. Ein Hauptmerkmal von DNA-Microarrays ist die hohe Multiplexingkapazität. Sie generieren in einem einzigen Experiment und damit in kurzer Zeit eine große Menge an genetischer Information und liefern Ergebnisse mit einem hohen Informationsgehalt.

4.2. DNA-Microarrays zur Resistenztestung

Eine der ersten Arbeiten, die DNA-Microarrays für den Nachweis von β -Lactam-Resistenzgenen einsetzten, wurde von Lee und Kollegen veröffentlicht (Lee et al. 2002). Die Autoren verwendeten PCR-Produkte als Sonden zum Nachweis von neun Resistenzgenen (PSE, OXA, FOX, MEN, CMY, TEM, SHV, OXY und AmpC). Damit konnten die Resistenzgene auf der Ebene der Genfamilie detektiert werden. Chen und Kollegen publizierten einen DNA-Microarray zur Identifikation von Virulenzfaktoren und Resistenzgenen bei *Salmonella* und *E. coli* (Chen et al. 2005). Von den 24 Resistenzgenen, die der Array abdeckt, betrafen nur drei die β -Lactam-Resistenz (*bla*_{TEM-1}; *bla*_{CMY-2}; *bla*_{PSE-1}). Als Sonden wurden ebenfalls PCR-Produkte verwendet. Aufgrund der Länge der PCR-Produkte von 400-800 bp konnte dieser Array zwar verschiedene Varianten dieser Gene detektieren, aber ebenfalls nicht differenzieren. Cleven und Kollegen verwendeten PCR-Produkt-basierte Sonden (200-800 bp) zur Identifikation und Charakterisierung von Erregern (*S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa*) aus Blutkulturen (Cleven et al. 2006). Es wurden jedoch zunächst nur zwei Sonden für β -Lactam-Resistenzgene integriert (*bla*_{TEM-106} und

bla_Z). Dieser Microarray wurde zwar in einer späteren Arbeit deutlich erweitert und mit einer Multiplex-PCR gekoppelt, so dass insgesamt 21 β -Lactam-Resistenzgene nachgewiesen werden konnten (darunter z. B. *bla_{TEM-106}*, *bla_{SHV-1}*, *bla_{CTX-M-22}* oder *bla_{FOX-3}*), am Sondenkonzept wurde jedoch festgehalten (Palka-Santini et al. 2009). Aufgrund der Länge der verwendeten PCR-Produkt-basierten Sonden ist eine Unterscheidung verschiedener Varianten der nachgewiesenen Gene nicht möglich. Der Nachweis bleibt auf die Genfamilie beschränkt. Speziell in den beiden letztgenannten Arbeiten scheint zudem die Auswahl der Resistenzgene willkürlich. Des Weiteren wurden Microarrays beschrieben, die sich mit der parallelen Detektion einer großen Anzahl von Resistenzgenen und/oder Virulenzfaktoren beschäftigen und dabei auf 70mer lange Oligonukleotide zurückgreifen. Bruant und Kollegen entwickelten einen Array für die Charakterisierung von *E. coli*-Isolaten. Unter den 189 Virulenzfaktoren und 30 Resistenzgenen fanden sich fünf β -Lactam-Resistenzgene (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-7}* oder *bla_{PSE-4}*) (Bruant et al. 2006). Frye und Kollegen beschrieben einen Array, der sowohl für gramnegative als auch grampositive Bakterien eingesetzt werden kann. 25 der insgesamt 94 nachweisbaren Resistenzgene betrafen die β -Lactam-Resistenz, darunter *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* und verschiedene *ampC* und *bla_{OXA}*-Gene (Frye et al. 2006). Diese Arrays haben einen hohen Informationsgehalt bezüglich der genetischen Ausstattung der untersuchten Bakterien-Spezies und liefern daher wichtige epidemiologische Daten. Obwohl die Spezifitäten der 70mer Sonden höher sind als die der langen PCR-Produkte, ist eine genauere Identifizierung der nachgewiesenen Gene auch mit diesem Sondenkonzept nicht möglich.

Die erwähnten Microarrays konnten also nicht die für einen ESBL-Nachweis nötigen Informationen liefern, da keine weitere Genotypisierung der relevanten *bla_{TEM}*-, *bla_{SHV}*- und *bla_{CTX-M}*-Gene durchgeführt wurde, die Rückschlüsse auf die Substratspektren der codierten Enzyme ermöglicht. Sie haben daher nur ein begrenztes Potential als diagnostische Werkzeuge in der klinischen Mikrobiologie. Ein weiterer Aspekt, der einen Einsatz dieser Assays wenig sinnvoll macht, ist die Tatsache, dass sehr lange Hybridisierungszeiten (über Nacht, 18 Stunden) verwendet wurden.

Perreten und Kollegen veröffentlichten 2005 einen Microarray zur Detektion von 90 Resistenzgenen grampositiver Bakterien, welcher auf der von Clondiag Chip Technologies (Clondiag, Jena, Deutschland) entwickelten ArrayTube Plattform basiert (Perreten et al. 2005). Hier spielt die β -Lactam-Resistenz nur eine untergeordnete Rolle. Die ArrayTube Plattform verbindet die Vervielfältigung der Ziel-DNA und die Hybridisierung mit dem Array in einem Reaktionsraum. Verschiedene Assays können in dieses Format überführt werden. Monecke und Kollegen haben auf dieser Plattform einen Oligonukleotid-Array zur Genotypisierung von Methicillin-resistenten *S. aureus* Isolaten (MRSA) entwickelt (Monecke und Ehrlich 2005). Auch der von Batchelor und Kollegen beschriebene Assay zum Nachweis von Resistenzgenen in gramnegativen Bakterien nutzt diese Technologie (Batchelor et al. 2008). Der entwickelte Microarray umfasst 55 Oligonukleotid-Sonden (20-30mer) zur Detektion von Genen, die für eine Reihe verschiedenen Resistenzen in *E. coli* und *Salmonella spp.* vermitteln. 16 dieser Sonden zielen auf den Nachweis von β -Lactam-Resistenzgenen inklusive einiger plasmidkodierter *ampC*-Gene ab. Die meisten Gene wurden auch in dieser Arbeit nur auf der Ebene der Genfamilien detektiert. Beispiele sind erneut *bla_{TEM}* und *bla_{SHV}* aber auch einige der Hauptgruppen der plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen (z. B. *bla_{CMY}* oder *bla_{FOX}*). Die Gene der CTX-M- und OXA- β -Lactamasen wurden auf der Ebene der verschiedenen Gruppen detektiert. Dafür umfasste der Array sechs Sonden zum Nachweis von *bla_{CTX-M-1}*-, *bla_{CTX-M-2}*- und *bla_{CTX-M-9}*-ähnlichen Genen und *bla_{OXA}*-Genen der Gruppen I-III. Zhu und Kollegen entwickelten einen Oligonukleotid-DNA-Microarray, der die β -Lactam-Resistenzgene in ähnlicher Weise abdeckt (Zhu et al. 2007a). Dabei wurden die Klasse A- β -Lactamasengene *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* und *bla_{CTX-M}* und die Gruppen der plasmidkodierten AmpC- β -Lactamasen (CMY, MOX, DHA, ACC, MIR, ACT und FOX) mit universellen Sonden detektiert. Der Array umfasste jedoch zusätzlich allelspezifische Sonden zur Genotypisierung sechs wichtiger Mutationen im *bla_{SHV}*-Gen.

Obwohl die aktuellen Arbeiten von Batchelor bzw. Zhu und Kollegen eine Tendenz zu einem differenzierteren Nachweis der β -Lactam-Resistenzgene zeigen, sind die beschriebenen Assays dennoch nicht in der Lage, umfangreiche Informationen über die Identität der nachgewiesenen Gene zu liefern. Der klinische Nutzen bezüglich der ESBL-Detektion bleibt daher limitiert.

Die ersten DNA-Microarray-basierten Ansätze, die eine umfangreiche Genotypisierung möglichst aller bekannten Polymorphismen vorsahen, waren die im Zuge des BMBF finanzierten GenoMik-Projekts (Genomforschung an Mikroorganismen) am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart entwickelten Prototypen zur Genotypisierung von *bla*_{TEM} (Grimm et al. 2004), *bla*_{SHV} (Grimm 2005), *bla*_{CTX-M} und *bla*_{OXA} (Henn 2006) (siehe 1.6). Diese Verfahren basierten auf den in Abbildung 1-4 und Abbildung 1-5 beschriebenen Abläufen, verfolgten also folgendes Konzept: (I) Die Microarrays sollten SONDENSÄTZE zur Identifikation aller bekannten Genvarianten der jeweiligen *bla*-Genfamilien umfassen. Im Falle von *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} handelte es sich dabei um nahezu alle bekannten Polymorphismen. Es wurden also alle klinisch relevanten Mutationen (ESBL, IRT) abgedeckt. Es wurden aber auch Mutationen, die zu anderen Eigenschaften (z. B. Stabilisierung) führen oder deren Effekte noch nicht bekannt sind, integriert. Durch die vollständige Identifizierung stehen in der Folge alle Informationen, die über die nachgewiesene Variante bekannt sind, zur Verfügung (Substratspektrum usw.). Bezüglich des reinen Gennachweises bestimmter β -Lactam-Resistenzgenfamilien ist anzumerken, dass dieser durchaus klinische Relevanz haben kann. So vermitteln CTX-M- β -Lactamasen stets Resistenzen gegenüber Cefotaxim, aber besitzen variable Aktivitäten gegenüber anderen Cephalosporinen. Auch der Nachweis einer plasmidkodierten Cephalosporinase ist so gut wie immer mit Resistenz gegenüber den meisten β -Lactam-Antibiotika verbunden. Eine genaue Identifizierung ist aber auch in diesen Fällen sinnvoll, da wichtige Daten zur Epidemiologie und Infektionskontrolle erhoben werden können. (II) Bezüglich der Sonden wurde auf das robuste Konzept der allelspezifischen Hybridsierung zurückgegriffen, das ohne Enzymreaktivität auskommt, die Verwendung von günstigen Materialien zulässt, einfach zu kontrollieren ist und trotzdem große Spezifitäten und Sensitivitäten aufweisen kann.

Auf der Basis dieser Studien beschäftigt sich die vorliegende Arbeit, die ebenfalls im Rahmen des GenoMik-Projektes angefertigt wurde, mit der Integration, Überarbeitung, Aktualisierung und Erweiterung dieser Chips für eine umfassende Genotypisierung der häufigsten β -Lactam-Resistenzgene.

4.3. ESBL-Microarray

4.3.1 Produktion der Ziel-DNA

Zur gleichzeitigen Genotypisierung nachgewiesener *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}-Gene mit Hilfe des ESBL-Chips mussten Strategien zur Amplifizierung und gleichzeitigen Markierung der Zielgene entwickelt werden. Essentiell war dabei die Produktion von Ziel-DNA-Fragmenten, die alle zur Identifikation bestimmter Allele notwendigen genetischen Merkmale abdecken. Hinsichtlich benötigter Zeit, Aufarbeitungsaufwand und Kosten ist die gleichzeitige Amplifikation der unterschiedlichen Zielgene in einem Multiplex-PCR-Format wünschenswert.

Für das PCR-Screening von klinischen Isolaten wurden bereits PCR-Protokolle zur gleichzeitigen Amplifikation verschiedener *bla*-Gene beschrieben. Monstein und Kollegen entwickelten eine Multiplex-PCR für *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} (Monstein et al. 2007). Die Größe der PCR-Produkte betrug 747, 445 bzw. 593 bp. Jemima und Kollegen entwickelten eine Multiplex-PCR für *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} mit PCR-Produkten von 1018 bp bzw. 544 bp

(Jemima und Verghese 2008). Die Größe der Produkte diene der Identifikation des *bla*-Gentyps, und die jeweiligen Sequenzabschnitte reichten nicht für eine vollständige Identifikation der Genvariante aus. Für die Vervielfältigung der verschiedenen Gruppen plasmidkodierter *bla*_{CTX-M}-Gene wurden in beiden Fällen universelle Primer eingesetzt, die ein PCR-Produkt von nur ca. 500-600 bp lieferten. Diese Primer sind jedoch zusätzlich in der Lage, chromosomale *bla*_{OXY}-Gene von *Klebsiella oxytoca*, die z. B. für die ESBL K1 codieren, zu amplifizieren. Zumindes bei chromosomaler DNA als *Template* ist mit diesen Primern keine Unterscheidung von CTX-M- und K1-vermittelter Resistenz bei *K. oxytoca* möglich. Auch Multiplex-PCR Protokolle von Microarray-basierter Methoden zur gleichzeitigen Detektion von Resistenzgenen amplifizieren in der Regel nur kurze Genabschnitte, die für eine Genotypisierung nicht ausreichen (Batchelor et al. 2008; Palka-Santini et al. 2009). So führte die von Zhu und Kollegen beschriebene zweistufige PCR-Methode zur Amplifikation von Klasse A-β-Lactamasengen (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}) und Gruppen der plasmidkodierten AmpC-β-Lactamasen zu einzelsträngigen Ziel-DNA-Fragmenten mit Längen zwischen 190 und 885 bp (Zhu et al. 2007a).

In dieser Arbeit wurde erfolgreich eine Multiplex-PCR zur Amplifizierung von *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} entwickelt, und sowohl zum Nachweis dieser Gene in klinischen Isolaten, als auch zur Produktion markierter Ziel-DNA für die Microarray-Hybridisierung eingesetzt. Die PCR-Produkte deckten dabei alle auf dem ESBL-Chip vertretenen Positionen ab. Zur Amplifikation ausreichend großer Genabschnitte der verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Gene können keine universellen Primer verwendet werden. Stattdessen mussten spezifische Primer für die *bla*-Gene der fünf CTX-M-Gruppen eingesetzt werden. Die Entwicklung eines ausreichend sensitiven und robusten Multiplexformats für die gleichzeitige Amplifikation von *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und aller fünf Gruppen der *bla*_{CTX-M}-Gene war trotz einer aufwendigen Optimierung des Primerdesigns und der Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich. Als Ursache für die Probleme bei der Etablierung wurden Homo- und Heterodimere der verschiedenen Primer für die unterschiedlichen *bla*_{CTX-M}-Gene identifiziert. Ähnliche Komplikationen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet (persönliche Kommunikation, Maya Rubtsova). Die Lösung dieses Problems durch die Wahl alternativer Primer-Positionen innerhalb des ORFs konnte nicht realisiert werden, da sonst die Abdeckung aller für die Genotypisierung relevanter Genabschnitte nicht mehr gewährleistet wurde. Von einer Entwicklung von Primern außerhalb des ORFs wurde abgesehen, da hierfür nicht ausreichend Sequenzinformationen zur Verfügung standen. Es konnten jedoch CTX-M-Primerpaare entworfen werden, die eine parallele Amplifikation aller *bla*_{CTX-M}-Gruppen bei denselben Reaktionsbedingungen, wie sie in der TEM/SHV-Dualplex-PCR verwendet wurden, erlaubt. Eine solche Vorgehensweise ist in der klinischen Diagnostik durchaus praktikabel, jedoch mit einem Mehraufwand an Probenmaterial und Reagenzien und damit Kosten verbunden. Außerdem müssen Abläufe für das Zusammenführen der einzelnen Produkte definiert werden.

Für die Validierung des ESBL-Microarrays mit klinischen Isolaten wurde eine alternative Strategie zur Produktion von CTX-M-Ziel-DNA verwendet. Dabei folgte auf den Nachweis und die Identifikation der Gruppenzugehörigkeit eines *bla*_{CTX-M}-Gens mit Hilfe einer von Woodford und Kollegen beschriebenen CTX-M-Multiplex-PCR (Woodford et al. 2006b) die Produktion der Ziel-DNA mit CTX-M-Gruppen-spezifischen Primern. Das Screening auf der Basis dieses PCR-Formats ist dabei CTX-M-spezifisch und amplifiziert keine *bla*_{OXY}-Gene von *Klebsiella oxytoca*. Es kann daher auch ohne Plasmid-DNA-Isolation mit Gesamt-DNA als *Template* durchgeführt werden, auch wenn *K. oxytoca*-Isolate in eine Studie aufgenommen wurden. Diese Abläufe optimieren die Produktion von CTX-M-Ziel-DNA vor allem bezüglich ihrer Wirtschaftlichkeit, und benötigtem Probematerial. Dafür wurden Einschränkungen bezüglich der Assaydauer aufgrund der zweistufigen Amplifikation akzeptiert.

4.3.2 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Die Hybridisierungseffizienz perfekt und nicht perfekt komplementärer Sonden wird neben Parametern des Sondendesigns und der Ziel-DNA auch von Faktoren der Arrayplattform, wie z. B. die Art der Sondenimmobilisierung oder Sondendichte in gedruckten Spots, beeinflusst. Die Sondensätze der TEM-, SHV- und CTX-M-Prototypen wurden auf eine einheitliche Hybridisierungstemperatur von 45 °C und 6x SSPE-Puffer als Hybridisierungslösung (definiert Salzgehalt) ausgelegt und optimiert. Nach der in dieser Arbeit durchgeführten Integration der drei Chips und den damit verbundenen Änderungen an der Array-Plattform (Aminomodifikation bei TEM-Sonden, Wechsel des Microarraysubstrats), musste daher die Leistungsfähigkeit der Sondensätze evaluiert werden. Die Bedingungen wurden als nicht ausreichend stringent bewertet und eine Optimierung der Hybridisierungsbedingungen durchgeführt. Da die Plattformänderungen vor allem die zuvor nicht markierten TEM-Sonden betrafen, wurden die Effekte einer Temperaturerhöhung, einer Verringerung des Salzgehalts und der Zugabe von SDS zur Hybridisierungslösung zunächst für diese Sondensätze betrachtet und später auf den integrierten Microarray übertragen. Sowohl bei der manuellen als auch bei der automatischen Hybridisierung konnten folgende bekannte Effekte beobachtet werden:

(I) Eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur führt zu einer Destabilisierung des Sonden/Ziel-DNA-Hybrids und dadurch zu einer Erhöhung der Stringenz (Religio et al. 2002). Die Folgen sind in der Regel niedrigere absolute Signalintensitäten und eine Erhöhung der Spezifität der Hybridisierung, da nicht perfekt komplementäre DNA/DNA-Hybride stärker destabilisiert werden. Interessanterweise konnte zunächst eine Erhöhung der Hybridisierungseffizienz bei einer Temperaturerhöhung von 45 °C auf 47 °C beobachtet werden, bevor durch eine weitere Erhöhung die Signalintensitäten deutlich sanken. Eine Erhöhung der Temperatur in diesem Bereich könnte zu einer besseren Zugänglichkeit der Ziel-DNA-Fragmente durch die Auflösung störender Sekundärstrukturen führen. Dieser Effekt wurde schon in anderen Arbeiten beobachtet (Henn 2006; Religio et al. 2002).

(II) Monovalente Kationen wirken stabilisierend auf den Sonden/Ziel-DNA-Hybrid, da sie negative Ladungen der DNA abschirmen (Owczarzy et al. 2004). Eine Verringerung der Salzkonzentration der Hybridisierungslösung führt daher ebenfalls zu einer größeren Stringenz und zu niedrigeren absoluten Signalen. Dies wurde bei allen Temperaturen beobachtet.

(III) Rose und Kollegen untersuchten den Einfluss von SDS auf die Hybridisierung von Sonden, die auf einer Nylon-Membran immobilisiert waren (Rose et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Studie korrelierten stark mit den in dieser Arbeit beobachteten Effekten. Die Autoren beschrieben ebenfalls einen positiven Einfluss von bereits niedrigen SDS-Konzentrationen (0,6 %) auf den Hintergrund. Außerdem folgerten sie aus ausführlichen thermodynamischen Berechnungen, dass SDS eine stabilisierende Wirkung auf den DNA/DNA-Hybrid aus Sonde und Ziel-DNA hat. Dadurch kann die vernachlässigbare Verringerung der absoluten Signalintensitäten trotz der Erhöhung der Stringenz während der Hybridisierung (höhere Temperatur, niedrigere Salzkonzentration) erklärt werden. Auch der tendenziell negative Einfluss größerer SDS-Konzentrationen auf die Spezifität der Hybridisierung könnte mit einer stärkeren Stabilisierung der nicht perfekt komplementären Sonden/Ziel-DNA-Hybride erklärt werden.

Durch die Anpassung der Hybridisierungsbedingungen auf eine Hybridisierungstemperatur von 47 °C, einen niedrigeren Salzgehalt (2x SSPE) der Hybridisierungslösung und den Einsatz niedriger SDS-Konzentrationen (0,01 - 0,1 %), konnte das durchschnittliche Diskriminierungsvermögen der getesteten Sondensätze um fast 30 % gesteigert werden, ohne aufgrund einer starken Verringerung der Signalintensitäten die Sensitivität des Chips zu verringern. Zusätzlich konnte die Qualität der Hybridisierungsexperimente und die Robustheit des Systems entscheidend verbessert werden. Die Bedingungen konnten erfolgreich auf den

integrierten ESBL-Chip und damit auf die SHV- und CTX-M-Chipmodule übertragen werden. Eine Erhöhung der Stringenz der Hybridisierung muss jedoch immer in Kombination mit Maßnahmen des Sondendesigns zur Verbesserung der Sondenspezifität betrachtet werden. So führten die Veränderungen bei einzelnen SONDENSÄTZEN zu Verschlechterungen des Diskriminierungsvermögens oder zu Signalintensitätsverlusten. Meist handelte es sich dabei um SONDENSÄTZE, die durch spezielle Maßnahmen des Sondendesigns an die vorherigen Bedingungen angepasst wurden (siehe 4.3.3). Diese wurden durch ein SONDEN-REDESIGNS an die neuen Bedingungen angepasst. Die Optimierungen der Hybridisierungsbedingungen wurden zunächst für die manuelle Hybridisierung (Thermomixer) durchgeführt. Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Versuche ist daher die Etablierung des TEM-Chips für die Hybridisierung mit Hilfe einer einfachen und kostengünstigen technischen Ausstattung. Im Gegensatz zu einer vorangegangenen Arbeit (Grimm 2005), die weniger stringente Hybridisierungsbedingungen verwendete, konnten mit den hier erarbeiteten Bedingungen auch bei kurzen Hybridisierungszeiten (1 bis 2 Stunden) im Thermomixer gute Spezifitäten erreicht werden.

4.3.3 Sondendesign und Redesign

Einer der wichtigsten Aspekte bei der Entwicklung von Oligonukleotid-Microarrays ist die Entwicklung von SONDEN mit gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Hybridisierungseffizienzen (Guo et al. 1994). Bei einem theoretisch optimalen SONDENSATZ sollten daher die Parameter GC-Gehalt, Länge und Schmelztemperatur (T_M) möglichst gleich sein (Bodrossy 2003). Zusätzlich sollten mögliche Sekundärstrukturen, die die Hybridisierung negativ beeinflussen könnten, vermieden werden. Da bei der Entwicklung von SONDENSÄTZEN zur Genotypisierung von Punktmutationen die groben Positionen der SONDEN festgelegt sind, und Schmelztemperaturen, GC-Gehalt und Sekundärstrukturen in erster Linie von der Abfolge der Basen im jeweiligen Sequenzabschnitt abhängen, müssen beim Sondendesign oft Kompromisse bezüglich dieser Parameter gefunden werden.

SNP-SONDENSÄTZE haben die Unterscheidung allelischer Varianten der Ziel-DNA zum Ziel. Dabei haben zentral gelegene Fehlpaarungen die stärksten Auswirkungen auf die Stabilität des SONDEN/ZIEL-DNA-HYBRIDS (Guo et al. 1994). Zur Entwicklung von SONDENSÄTZEN mit optimalem Diskriminierungspotential werden die SONDEN daher so positioniert, dass sich die zu untersuchende Punktmutation möglichst zentral in der SONDENSEQUENZ befindet. Bezüglich der SONDENPOSITION verbleibt also beim Design kurzer OligonukleotidsONDEN (15 - 30mer) nur sehr wenig Spielraum (einige Nukleotide), so dass vor allem die SONDENLÄNGE zur Justierung von Schmelztemperatur und Sekundärstrukturen verbleibt.

Da es sich bei den in dieser Arbeit entwickelten SONDEN um SONDENSÄTZE zur Erweiterung eines bereits vorhandenen SONDEN-PORTFOLIOS handelte und gewährleistet werden sollte, dass sich die neuen SONDEN integrieren lassen, waren die Parameter für das Sondendesign vorgegeben. Der Schmelztemperaturbereich der entwickelten SONDEN zur Erweiterung der TEM- und SHV-Chipmodule war um fast 3 °C kleiner als der T_M -Bereich aller bereits vorhandenen SONDEN. Die Integration der SONDEN war daher problemlos möglich. Die strengen Vorgaben bezüglich der Stabilitätswerte von Sekundärstrukturen konnten nicht für alle Positionen erfüllt werden.

Sekundärstrukturen können die Zugänglichkeit der Sonde für die Ziel-DNA und damit die Hybridisierungseffizienz verringern (Southern et al. 1999). Ein interessanter Aspekt des Sondendesigns ist, inwiefern sich die *in silico* berechneten und als kritisch bewerteten Sekundärstrukturen tatsächlich negativ auf das Hybridisierungsergebnis auswirken. Auch deshalb, weil die Stabilitäten der Sekundärstrukturen (ΔG -Werte) für die Situation in Lösung und nicht für den komplexeren Fall der Hybridisierung mit immobilisierten SONDEN (Levicky und Horgan 2005) berechnet werden. Zusätzlich werden Eigenschaften der Ziel-DNA nicht berücksichtigt. Für den SONDENSATZ SHV 148 wurden bei allen vier SONDEN kritische

ΔG -Werte für Haarnadel-Strukturen berechnet. Es wurde daher kein negativer Einfluss auf das Diskriminierungsvermögen dieses Sondensatzes festgestellt. Auch auf die absoluten Signalintensitäten hatte diese Sekundärstruktur keinen negativen Effekt. Ähnliche Ergebnisse lieferte der Sondensatz TEM 114.a. Auch Dimer-Strukturen im Bereich von $\Delta G_{\text{Dimer}} = -10$ kcal/mol hatten keinen negativen Einfluss auf die Hybridisierungseffizienzen von TEM 221.a und TEM 224.a. Für das Diskriminierungsvermögen eines SNP-Sondensatzes ist es problematisch, wenn einzelne Sonden und im Besonderen die zur Ziel-DNA perfekt komplementäre Sonde niedrigere Hybridisierungseffizienzen aufweisen. Aufgrund der berechneten Sekundärstrukturen wurde diese Situation für die Sondensätze SHV 61.a, SHV 134.a und SHV 269.a erwartet. Während für SHV-61.a eine eindeutige Korrelation des falschen Hybridisierungsergebnisses mit stabilen Dimer-Strukturen der G- und C-Sonden beobachtet werden konnte, hatten Dimer-Strukturen bei SHV 134.a und SHV 269.a keine negativen Auswirkungen auf die Diskriminierung. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass trotz ausführlichen theoretischen Abschätzungen keine eindeutige Voraussage der Auswirkungen von Sekundärstrukturen unter bestimmten experimentellen Bedingungen (Hybridisierungsbedingungen, Array-Plattform) möglich und eine experimentelle Evaluierung der entworfenen Sonden notwendig ist.

Zur Entwicklung von Sonden an problematischen Sequenzabschnitten waren die Möglichkeiten des Standard-Sondendesigns sehr limitiert. So konnten z. B. die Dimer-Strukturen des SHV 61 Sondensatzes nicht umgangen werden. Auch der Entwurf von Sonden in GC-reichen Sequenzabschnitten (z. B. TEM 224) unter Einhaltung der T_M - und Längenvorgaben war kaum möglich. Zur Korrektur und Verbesserung der Spezifität einzelner Sondensätze und zur Vergrößerung der Flexibilität bei der Sondenentwicklung musste daher ein alternatives Konzept verwendet werden.

Um die Spezifität von Hybridisierungs-basierten SNP-Nachweismethoden zu erhöhen, wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, darunter die zusätzliche Nutzung der Spezifität einer enzymatischen Reaktion (DNA-Ligase- oder Primerelongations-Assays) oder die Verwendung anderer Sondentypen (Molecular Beacons, PNA- und LNA-Sonden) (siehe 1.5.2). Diese Verfahren sind jedoch aufgrund der benötigten Komponenten und der zusätzlich durchzuführenden Reaktionen nicht mit den hier beschriebenen DNA-Microarrays kompatibel. In dieser Arbeit wurden daher die Effekte von zusätzlich eingebauten Fehlpaarungen (künstlichen Mismatches) genutzt. Diese wurden bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Während Guo und Kollegen künstliche Nukleotide in die Sequenzen von kurzen allelspezifischen Oligonukleotiden (15mer) einfügten, um die Diskriminierung zu erhöhen (Guo et al. 1997), betrachteten Letowski et al. das Hybridisierungsverhalten von 50mer langen Sonden nach Einbau von zusätzlichen „normalen“ Fehlpaarungen (Letowski et al. 2004). Beide Arbeiten berichteten von einem stärkeren Einfluss des zusätzlichen Mismatches auf die Hybridisierung, je zentraler dieses in der Sondensequenz positioniert war. Guo und Kollegen beobachteten zusätzlich einen Einfluss der Distanz zweier Fehlpaarungen und fanden den größten Effekt bei einem Abstand von 3 - 4 Nukleotiden. Lee und Kollegen machten Vorschläge für die Entwicklung kurzer (19mer) und nicht perfekt komplementärer Sonden (Lee et al. 2004). Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigten einen starken Einfluss der Identität der am Austausch beteiligten Nukleotide bei Hybridisierungen in Lösung. Dieser war sogar größer als der Einfluss der Position, und am größten beim Austausch eines Guanins. Auf der Basis dieser Beobachtungen und den berechneten Informationen bezüglich der Destabilisierung möglicher Sekundärstrukturen durch den Austausch bestimmter Nukleotide, wurden für problematische Positionen Sondensätze mit künstlichen Fehlpaarungen entworfen. Um eine zu starke Verringerung der Hybridisierungseffizienz zu verhindern, wurde zur Feinjustierung der Eigenschaften meist eine Verlängerung der Sonden durchgeführt.

Letztendlich führte dieses Sondendesign in sechs Fällen zu einer eindeutigen Verbesserung der Sondereigenschaften. Für die Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule wurden vier Sondensätze ausgewählt, die auf diesem Konzept basieren.

Zwei weitere SHV-Sondensätze wurden während des Redesigns entwickelt. Erst der Einbau von Fehlpaarungen führte bei drei Sondensätzen zur korrekten Spezifität (SHV 61, SHV 226 und SHV 268) und ermöglichte so den erfolgreichen Entwurf von Sonden zur Genotypisierung dieser Positionen. Bei drei weiteren Sondensätzen wurde eine Verbesserung des Diskriminierungsvermögens erzielt (TEM 114, TEM 179 und TEM 224).

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel für den umgekehrten Fall beschrieben (siehe 4.3.2), muss auch eine Erhöhung der Spezifität der Hybridisierung auf der Basis des Sondendesigns immer in Kombination mit weiteren experimentellen Bedingungen, vor allem den Hybridisierungsbedingungen, betrachtet werden. In den vorangegangenen Arbeiten zum SHV- und CTX-M-Chipmodul wurde der Einbau von künstlichen Fehlpaarungen bereits in einigen Fällen angewendet. Die Hybridisierung wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch bei niedrigerer Stringenz durchgeführt, so dass die Erhöhung der Spezifität der Hybridisierung (siehe 3.1.4.2) die Hybridisierungseffizienzen dieser Sondensätze teilweise zu stark verringerte. Die Erhöhung der Stringenz war teilweise ausreichend, um gute Spezifitäten mit konservativ entworfenen Varianten dieser Sonden zu erzielen, so dass der Einbau von Fehlpaarungen rückgängig gemacht werden konnte. Der Sondensatz SHV 238/240 ist das wichtigste Beispiel. Nach der Validierung des ESBL-Chips mit klinischen Isolaten standen ausreichend Daten für die Beurteilung der CTX-M Sondensätze zur Verfügung, und tatsächlich scheint diese Vorgehensweise auch für einige Sondensätze des CTX-M-Chipmoduls sinnvoll. Speziell bei Sondensätzen mit mehreren künstlichen Mismatches (CTX-M 23 und CTX-M 77) sollte auf ein deutlich konservativeres Design zurückgegriffen werden.

4.3.4 Aktualisierung und Abdeckung

Teil des Konzepts der in dieser Arbeit entwickelten Microarrays zur Genotypisierung von Resistenzgenen war es, ein diagnostisches Werkzeug bereitzustellen, das die Identifizierung aller bekannten Varianten der betrachteten Gene erlaubt. Auf die klinische Bedeutung einzelnen Polymorphismen bzw. den Nutzen einer Identifikation für epidemiologische Fragestellungen wurde bereits eingegangen (siehe 1.2 und 4.2). Um diesem Ansatz gerecht zu werden, wurde eine Aktualisierung der TEM- und SHV-Chipmodule durchgeführt. Nach der dazu notwendigen Integration von Sondensätzen zur Identifizierung von jeweils 11 weiteren Polymorphismen in bla_{TEM} und bla_{SHV} , war der ESBL-Chip zu diesem Zeitpunkt in der Lage, fast alle bekannten bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Allele zu unterscheiden (Ausnahmen siehe 3.1.4.1). Eine DNA-Microarray-basierte Genotypisierungsplattform, wie sie hier beschrieben wurde, muss selbstverständlich weiter aktualisiert werden sobald, neue Mutationen beschrieben werden. Im Verhältnis zu den zum Zeitpunkt der Chip-Entwicklung bereits beschriebenen allelischen Varianten, wurden seither in der Literatur vor allem weitere CTX-M- β -Lactamasen beschrieben.

Der ESBL-Chip ist daher aktuell in der Lage, 99 % der TEM-, 89 % der SHV- und jeweils über 80 % der CTX-M- β -Lactamasen der Gruppen M1 und M2 zu identifizieren. Lediglich für die CTX-M-Gruppen M9 und M8/M25 sank dieser Wert auf 50 %. Obwohl die CTX-M- β -Lactamasen inzwischen die weltweit häufigste β -Lactamase-Spezies darstellen, scheint die genetische Diversität der bla_{CTX-M} -Gene gerade erst aufgedeckt zu werden. Im besonderen Maß gilt dies für die bla_{CTX-M} -Gene der Gruppen M9 und M8/M25. Mit welcher Häufigkeit diese neuen Varianten vorkommen ist noch nicht geklärt. Sie scheinen jedoch selten zu sein oder wurden nur ein einziges Mal beschrieben. Aufgrund der gleichzeitigen Genotypisierung der drei wichtigsten bla -Gene einerseits und der weiterhin großen Abdeckung an Polymorphismen innerhalb dieser Gene andererseits, ist der ESBL-Chip auch aktuell in der Lage praktisch alle im Moment vorherrschenden ESBLs in gramnegativen Bakterien zu detektieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Aktualisierung einzelner Chipmodule und die Integration der drei Chipmodule ist ein Beweis, dass die gewählten Bedingungen eine weitere Integration einzelner Sondensätze zum Nachweis weiterer Mutationen oder zur Genotypisierung weiterer relevanter Gene zulassen. Dies ist zusätzlich in einem für die klinische Diagnostik angemessenen Zeitrahmen möglich. Die ESBL-Chip-Ergebnisse besitzen bereits jetzt einen herausragenden Informationsgehalt. Dieser wird durch die Integration der ebenfalls in dieser Arbeit entwickelten bzw. weiterentwickelten AmpC- und OXA-Chipmodule weiter ansteigen.

4.3.5 Integration und Qualität der Microarray-Herstellung

Die Integration der TEM-, SHV- und CTX-M-Microarrayprototypen wurde zunächst erfolgreich in einer Machbarkeitsstudie gezeigt. Die auf ähnliche Bedingungen ausgelegten Sondensätze waren tatsächlich kompatibel. Dadurch konnten auf der Basis der Sondereigenschaften dieser Arrays Vorgaben für das Design weiterer Sondensätze zur Chip-Aktualisierung und -Erweiterung entwickelt werden. Bei gleichzeitiger Hybridisierung von Ziel-DNA-Mischungen konnte der komplette Chip bei derselben PMT gescannt und ausgewertet werden. Dies vereinfacht die Post-Hybridisierungs-Prozeduren (Scannen, Quantifizierung, Auswertung) erheblich. Auf starke Schwankungen im Mengerverhältnis der verschiedenen Ziel-DNAs oder auf verschiedene Einbauraten kann jedoch theoretisch reagiert werden, indem die einzelnen Chipmodule bei verschiedenen PMT-Verstärkungen gescannt und ausgewertet werden. Eine ähnliche Vorgehensweise wird häufig bei der Auswertung von Microarrays zur Expressionsanalyse angewendet.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Produktion des bis dahin verwendeten Microarraysubstrats (*Epoxy coated glass slides*, 3D) durch den Hersteller eingestellt. Im Zuge der dadurch erforderlichen Umstellung des DNA-Microarray-Herstellungsprozesses wurden folgende Änderungen der Arrayplattform erfolgreich durchgeführt: Wechsel des Microarraysubstrats, Vereinheitlichung der Immobilisierungsschemie der Sonden und Umgestaltung des Layouts. Der Wechsel des Microarraysubstrats zog Optimierungen in den Bereichen Druckpuffer, Spotmorphologie und Zusammensetzung der Hybridisierungslösung nach sich. Die erfolgreiche Optimierung führte zu ausgezeichneten Spotmorphologien und exzellenten Hintergründen bei der Hybridisierung. Durch die Wahl eines modularen Layouts, wurde der Chip bereits für eine Erweiterung vorbereitet. Die Vereinheitlichung der Kopplungsschemie wurde aus zwei Gründen durchgeführt: (I) Die gleichzeitige Immobilisierung von Sonden mit und ohne Aminomodifikation war erfolgreich auf den ursprünglich verwendeten *Slides*. Es konnte jedoch nicht abgeschätzt werden, inwiefern dieses Ergebnis auf *Slides* anderer Hersteller übertragbar ist. (II) Eine endständige Immobilisierung wirkt sich auf das Verhalten der Sonden bei der Hybridisierung aus (Levicky und Horgan 2005; Peterson et al. 2002). Auch der Einfluss von möglichen Sekundärstrukturen, wie beispielsweise Haarnadel-Strukturen, unterscheidet sich bei einer gerichteten und ungerichteten Immobilisierung. Das Verhalten aller Sonden bei der Immobilisierung und Hybridisierung sollte jedoch unter den gleichen Gesichtspunkten betrachtet werden können, ohne den Faktor Immobilisierung berücksichtigen zu müssen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde immer wieder von Problemen bei der Herstellung der DNA-Microarrays im Kontaktdruckverfahren berichtet (Cheung et al. 1999; Grimm 2005; Martinsky 2003). So wurden z. B. ungewöhnlich hohe Variationen der Signalintensitäten von Spot-Replikaten, nicht akzeptable Spotmorphologien oder das Fehlen einzelner Sonden im Layout beobachtet. Die entsprechenden Sondensätze mussten aus der Auswertung herausgenommen werden. Die Gründe für diese Fehler sind häufig in den Abläufen und Komponenten des Kontaktdruckverfahrens zu suchen. Mögliche Ursachen sind z. B. das Verstopfen des Spalts der Nadel (Split Pin), mit der die Sondenlösung auf die Oberfläche eines Trägers übertragen wird, mit Staubpartikeln, ein unvollständiges Füllen der Pin aufgrund einer nicht vollständig durchmischten Sondenlösung oder ein zu niedriger Füllstand

der Sondenlösung in der entsprechenden Kavität. Außerdem können schwankende Eigenschaften des Microarraysubstrats die Interaktion der Nadel mit der Oberfläche beeinflussen und zu negativen Effekten beim Absetzen der Sondenlösung führen. Im Laufe dieser Arbeit wurde der Druckprozess stetig optimiert und einzelne Komponenten der Prozesses ausgetauscht (Wechsel der Split Pins, des Microarraysubstrats und des Druckpuffers). Diese Optimierungen führten zu ausgezeichneten Ergebnissen bei der Herstellung des ESBL-Chips. Bei keinem der für die Validierung verwendeten Microarrays (insgesamt über 120) mussten einzelne Sonden bzw. SONDENSÄTZE aufgrund von nicht oder schlecht übertragener Sonden aus der Auswertung herausgenommen werden. Als einziger Qualitätsmangel der Herstellung kann daher das in Kapitel 3.1.5.7 beschriebene „Verschleppen“ der Druckkontrollen nach Fertigstellung der ersten acht Subarray angesehen werden. Welches in der Folge zu falschen Ergebnissen des SONDENSÄTZE CTX-M 29 führte und durch Änderungen im Druckablauf oder Chip-Layout verhindert werden kann. Die Qualitätskontrolle bei der Herstellung und Auswertung von diagnostischen Microarrays ist ein kritischer Punkt. Da ein visuelles Erkennen von Mängeln nur von geschultem Personal bewerkstelligt werden kann, zeitintensiv und zu einem gewissen Maß willkürlich ist, sind automatisierte Verfahren zur Qualitätssicherung erforderlich. Dies gilt insbesondere bei sehr umfangreichen Arrays wie beispielsweise dem ESBL-Chip. Auf der Ebene der Daten-Prozessierung kann z. B. die automatische Filterung von Spots sinnvoll sein. Hierfür wurden bereits Algorithmen beschrieben, die unterschiedliche Parameter und Qualitätsindizes in Verbindung mit definierten Grenzwerten zur Erkennung mangelhafter Spots verwenden (Sauer et al. 2005; Wang et al. 2001). Die Grenzwerte müssen jedoch für jede Microarrayplattform individuell ermittelt werden.

4.3.6 Validierung mit klinischen Isolaten

Der ESBL-Microarray wurde mit 60 verblindeten klinischen Isolaten getestet, die in der täglichen Routine am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart und am Universitätsklinikum der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main gesammelt wurden. Alle Isolate wurden phänotypisch charakterisiert. Zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität des Microarray-basierten Resistenznachweises, wurde diese Charakterisierung als Goldstandard betrachtet. Der in dieser Arbeit beschriebene Assay zeigte eine hohe Sensitivität von über 93 % und eine Spezifität von 100 %. Die mit Hilfe des Microarray ermittelten genotypischen Daten stimmten in 100 % mit den Sequenzierungen der nachgewiesenen Gene überein. Die sehr hohe Spezifität des Assays hat ihre Ursache in der sehr kleinen Zahl von nur zwei als sensitiv (nicht ESBL-produzierend) charakterisierten Proben, die in dieser Studie analysiert wurden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag eindeutig auf der Genotypisierung von ESBL-produzierenden Isolaten und der Nutzung dieser klinischen Proben zur Evaluierung der Leistungsmerkmale des entwickelten integrierten Microarrays. Zukünftige Untersuchungen mit einem entsprechenden Studiendesign werden zuverlässigere Daten bezüglich der Spezifität liefern. Die Sensitivität des Assays basiert auf dem Nachweis von ESBLs in 54 der 58 phänotypisch als ESBL-Produzenten charakterisierten Isolate. Bei drei der vier Isolate, bei denen keine TEM-, SHV- oder CTX-M-ESBL detektiert wurde, handelte es sich um *E. coli*-Isolate für die zusätzlich das Vorhandensein eines plasmidkodierten *ampC*-Gens der *C. freundii*-Gruppe ausgeschlossen wurde. CMY-2, als Vertreter dieser Gruppe, ist die am häufigsten nachgewiesene plasmidkodierte AmpC- β -Lactamase in dieser Spezies (Alvarez et al. 2004; Mammeri et al. 2008; Philippon et al. 2002). Der resistente Phänotyp könnte daher durch weitere Resistenzmechanismen verursacht werden, wie z. B. das Vorhandensein einer plasmidkodierten Cephalosporinase eines anderen Typs, einer Metallo- β -Lactamase, einer Klasse A Carbapenemase oder Promotormutationen im chromosomalen *ampC*-Gen von *E. coli*. Voraussetzung für eine Diskussion in diese Richtung sind jedoch Zweifel an den phänotypisch ermittelten Daten, da alle drei Isolate einen positiven ESBL-Test zeigten und die erwähnten Enzyme nicht oder nur schwach durch Inhibitoren gehemmt werden. Auch Carbapenemase-Aktivität wurde nicht nachgewiesen. Zweifel sind jedoch grundsätzlich erlaubt, da auch phänotypische Methoden zur ESBL-Detektion

unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten besitzen (siehe 4.1). In zwei Studien von Wiegand bzw. Thomson und Kollegen (Thomson et al. 2007; Wiegand et al. 2007) wurden die Sensitivität und Spezifität des VITEK 2 Systems auf ca. 85 – 89 % und 85 - 94 % beziffert. Interessanterweise spielt bei Studien dieser Art die molekularbiologische Charakterisierung der Isolate eine entscheidende Rolle. Auch der negative VITEK ESBL-Test des für CTX-M-15 positiven *E. coli*-Isolates 33 (Tabelle 3-8) kann eventuell mit den Eigenschaften des VITEK Systems erklärt werden. Zu Isolat 33 ist jedoch anzumerken, dass dieses Isolat aufgrund der weiteren zur Verfügung stehenden phänotypischen Daten trotzdem als „ESBL-positives“ Isolat in die Studie aufgenommen wurde (siehe 2.1.7.2). Aufgrund der berechtigten Zweifel an der phänotypischen Charakterisierung der Isolate, könnte der ermittelte Sensitivitätswert also zu niedrig ausfallen. Beim vierten Isolat handelte es sich um ein *C. freundii*-Isolat und damit um einen AmpC-Produzenten. Eine mögliche Deregulierung des chromosomalen *ampC*-Gens könnte den resistenten Phänotyp erklären. Das VITEK 2 System zeigte für Spezies mit induzierbaren *ampC*-Genen nur eine Spezifität von < 40 %. Zusätzlich sind die Grenzwerte des CLSI für diese Spezies nicht gültig.

Da sich die hier beschriebenen Sensitivitäts- und Spezifitäts-Werte auf den eindeutigen Nachweis eines ESBL-Genes beziehen und andere Microarray-Arbeiten dies nicht leisten können, ist ein Vergleich der Daten nicht möglich. Sensitivitäts- und Spezifitäts-Werte, die sich über den Gennachweis definieren (evtl. gekoppelt mit Sequenzierung), besitzen nicht dieselbe Aussagekraft.

Das Ziel des molekularbiologischen Nachweises von Resistenzgenen ist, dem behandelnden Arzt Informationen über das Resistenzpotential eines Infektions-auslösenden Keims bereitzustellen. Er entspricht jedoch nicht einer Empfindlichkeitstestung. Für die Isolate standen zunächst nur bereits interpretierte Empfindlichkeitsdaten aus Agardiffusionstests und E-Tests zur Verfügung. Um eine umfangreichere Betrachtung der Korrelation zwischen detektiertem Genotyp und phänotypischen Verhalten der einzelnen klinischen Stämme zu gewährleisten, wurden am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart für alle Isolate minimale Hemmkonzentrationen gegenüber den relevanten Substanzen ermittelt. Die bekannten Eigenschaften der mittels DNA-Microarray identifizierten *bla*-Genvarianten korrelierten sehr gut mit den gemessenen MHKs. Für die nachgewiesenen SHV- und CTX-M-ESBLs spiegelten sich die vermuteten Substratpräferenzen für Ceftazidim bzw. Cefotaxim in den MHK-Werten wieder. Auch die höhere Aktivität von CTX-M-15 gegenüber CTX-M-3, CTX-M-9 und CTX-M-14 (aufgrund der Asp240Gly-Substitution) war aus den MHKs ersichtlich. Aufgrund maximaler MHK-Werte ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$) konnte bei den CTX-M-15-positiven Isolaten oft das MHK-Verhältnis CTX/CAZ nicht interpretiert werden. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um Isolate verschiedener *Klebsiella* spp. Eine mögliche Erklärung könnte ein Verlust von Porinen der äußeren Zellmembran darstellen (OmpK35 und OmpK36), wie er oft für ESBL-produzierende *K. pneumoniae*-Stämme beschrieben wurde (Martinez-Martinez 2008). Für das abweichende Verhalten von Iso-46 konnte keine plausible Erklärung gefunden werden. Selbst die Produktion einer zweiten ESBL neben der detektierten CTX-M-9 könnte die niedrige MHK für Cefotaxim nicht erklären. Die vier Isolate, für die keine TEM-, SHV- und CTX-M-ESBL nachgewiesen werden konnte, zeigten unterschiedliche CTX/CAZ MHK-Verhältnisse, was für unterschiedliche Resistenzmechanismen spricht. Das MHK-Verhältnis CTX/CAZ < 1 der Isolate 44, 31 und 54 könnte bei der Produktion einer Cephalosporinase (AmpC) erwartet werden, während Iso-53 eine deutlich höhere MHK gegenüber Cefotaxim zeigte. Der ESBL-Microarray lieferte ausreichend Daten für eine umfassende Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Die spätere Integration der ebenfalls in dieser Arbeit entwickelten bzw. weiterentwickelten AmpC- und OXA-Chips wird den Informationsgehalt noch einmal deutlich erhöhen.

Der klinische Nutzen der Daten, die der vorgestellte Microarray liefern kann, erschließt sich bei der Betrachtung einer Studie, die retrospektiv verschiedene SHV-ESBL-Varianten, darunter auch die in dieser Arbeit identifizierten Varianten SHV-12 und SHV-5, mit dem Behandlungserfolg schwerer *E.coli*- and *K. pneumoniae*-Infektionen in einer Nicht-Ausbruch-

Situation korrelierte (Wong-Beringer et al. 2002). In der Regel versagte die empirische Behandlung der entsprechenden ESBL-produzierenden Erreger mit einem Drittgeneration-Cephalosporin (Ceftazidim). Hätte der behandelnde Arzt während seiner Therapie-Entscheidung auf das Ergebnis des beschriebenen Arrays zurückgreifen können, hätte er anstatt des eingesetzten Cephalosporins höchstwahrscheinlich ein Carbapenem für die Therapie gewählt (Paterson 2000).

In Kapitel 1.2.4 wurde ausführlich auf die Epidemiologie von ESBL-produzierenden Isolaten eingegangen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen weitgehend mit der aktuellen Situation in Europa überein (Canton et al. 2008b; Livermore et al. 2007):

(I) CTX-M- β -Lactamasen haben in vielen europäischen Ländern die β -Lactamasen des TEM- und SHV-Typs als vorherrschende ESBL-Spezies abgelöst. Auch in dieser Studie waren die CTX-M- β -Lactamasen die ESBL-Spezies mit der höchsten Prävalenz. Bei über 72 % der 58 als resistent charakterisierten klinischen Isolate konnte ein CTX-M-ESBL-Gen nachgewiesen werden. Bezogen auf alle 57 nachgewiesenen ESBL-Gene, handelte es sich bei 77 % um bla_{CTX-M} -Gene; nur bei 23 % um bla_{SHV} -Gene. Interessanterweise wurden zwar Kombinationen dieser Gene detektiert (2x bla_{CTX-M} , 1x bla_{CTX-M} und 1x bla_{SHV}), jedoch kein ESBL-Gen des TEM-Typs. Es wurde jedoch in über 63 % der getesteten Isolate ein bla_{TEM-1} -Gen nachgewiesen, welches nicht für eine ESBL codiert. Über 28 % der getesteten Isolate besaßen ein bla_{SHV-1} -Gen. Dieser Umstand unterstreicht erneut, dass der Gennachweis alleine nicht als diagnostischer Parameter ausreicht und eine Identifizierung dieser bla -Gene nötig ist.

(II) CTX-M-ESBLs werden oft von *E. coli*-Isolaten produziert. Tatsächlich konnte die Resistenz der 29 getesteten *E. coli*-Isolate in über 86 % auf das Vorhandensein eines CTX-M-ESBL-Gens zurückgeführt werden. Bei den getesteten *Klebsiella*-Isolaten wurden SHV-ESBLs und CTX-M-ESBLs mit ähnlichen Häufigkeiten nachgewiesen.

(III) CTX-M-15 ist die inzwischen vorherrschende ESBL in Europa und wurde auch in dieser Studie am häufigsten nachgewiesen. Insgesamt wurden fast 60 % der detektierten ESBL-Gene als CTX-M-15 identifiziert. Innerhalb der CTX-M-ESBLs betrug der Anteil sogar 81 %.

(IV) SHV-12 ist die häufigste Variante der SHV-Genfamilie und wurde weltweit hauptsächlich in *K. pneumoniae*-Isolaten detektiert. Auch dieser Trend wurde erkannt. 85 % der detektierten SHV-ESBLs wurden als SHV-12 identifiziert und ausschließlich in verschiedenen *Klebsiella*-Isolaten nachgewiesen. Auch die weiteren identifizierten SHV-(SHV-5) und CTX-M-Varianten (CTX-M-3, CTX-M-9 und CTX-M-14) zählen zu den häufigsten Allelen der jeweiligen Genfamilien und CTX-M-Gruppen.

In zwei *E. coli*-Isolaten wurde CTX-M-14b nachgewiesen. CTX-M-14b entspricht auf der Aminosäureebene CTX-M-14 und wurde in beiden Isolaten zusammen mit CTX-M-15 nachgewiesen. Aus klinischer Sicht muss CTX-M-14b als CTX-M-14 interpretiert werden. CTX-M-14b unterscheidet sich von CTX-M-14 durch eine stille Punktmutation im Codon für Aminosäure 121, und dadurch nur noch in einem einzigen Nukleotid von CTX-M-9. Diese stille Mutation ist häufig bei bla_{CTX-M} -Allelen der Gruppen M2 und M9, und wird teilweise für die Varianten-Identifikation genutzt. Entsprechende SONDENSÄTZE wurden als einzige SONDENSÄTZE, die eine stille Mutation detektieren in das Array-Layout integriert (CTX-M 121.M2 und CTX-M 121.M9). Dadurch war die Identifizierung von CTX-M-14b möglich. Navarro und Kollegen zeigten zusätzlich, dass die Umgebung des $bla_{CTX-M-14b}$ -Gens der für $bla_{CTX-M-9}$ beschriebenen Umgebung entspricht und nicht der für $bla_{CTX-M-14}$ (Navarro et al. 2007). Die Unterscheidung zwischen den CTX-M-14 und CTX-M-14b ist ein gutes Beispiel für den großen Informationsgehalt der Microarray-Ergebnisse. Aus epidemiologischer Sicht ist auch die Tatsache interessant, dass beide *E. coli*-Isolate vom gleichen Patienten (Rachenabstrich und Blasenkatheterspitze) stammten. Beide Infektionen wurden wahrscheinlich vom selben Infektionserreger ausgelöst. Eine getrennte Auswertung

der in Stuttgart und Frankfurt gesammelten Isolate wurde nicht vorgenommen. Nichtsdestotrotz war keiner der nachgewiesenen Genotypen explizit auf Isolate einer der beiden Kliniken beschränkt.

4.3.7 Leistungsmerkmale des Assays

Ein DNA-Microarray zur Genotypisierung muss korrekt, hoch spezifisch und reproduzierbar zwischen allelspezifischen Merkmalen der Ziel-DNA unterscheiden können. Entscheidend für die Leistungsfähigkeit des gesamten Arrays sind dabei die verschiedenen Diskriminierungsvermögen der einzelnen SONDENSÄTZE. Diese resultieren aus den Spezifitäten und Hybridisierungseffizienzen der einzelnen Sonden eines SONDENSÄTZE bei den verwendeten experimentellen Bedingungen, und werden durch Parameter des SONDENSÄTZEDESIGNS (Schmelztemperatur, Sekundärstrukturen), der Ziel-DNA (Sequenzkontext, DNA-Menge, Fragmentlänge), der Array-Plattform (Immobilisierung der Sonden) und Hybridisierungs- bzw. Waschbedingungen (Temperatur, Stringenz, Dauer, Mischung) beeinflusst. Nach umfangreichen Optimierungen, vor allem in den Bereichen Hybridisierungsbedingungen und SONDENSÄTZEDESIGN, zeigten die SONDENSÄTZE aller drei Chipmodule des ESBL-Chips insgesamt sehr gute Eigenschaften.

Alle SONDENSÄTZE lieferten korrekte Ergebnisse. Auch die Spezifität des SONDENSÄTZE für Position 29 der CTX-M-9-ähnlichen β -Lactamasen kann als korrekt bewertet werden, da die zunächst falschen Ergebnisse auf ein Artefakt des Array-Herstellungsprozesses zurückgeführt werden konnten. An einer anderen Position im Array-Layout hätte dieser Satz korrekte Ergebnisse geliefert. Wenn man diese Bewertung auch bei der Betrachtung der Leistungsfähigkeit der einzelnen SONDENSÄTZE berücksichtigt, zeigten, bis auf eine Sonde des TEM 237.2 SONDENSÄTZE, alle Mismatch-Sonden relative Signale unter 60 % des jeweiligen Perfect Match-Signals. Da die Diskriminierung in dieser Arbeit als Signalintensitäts-Verhältnis zwischen Mismatch und Perfect Match berechnet wurde, entspricht dies RI_{MM} -Werten unter 0,6. Die von Zhu und Kollegen entwickelten allelspezifischen Sonden zur Genotypisierung von sechs Mutationen im bla_{SHV} -Gen zeigten RI_{MM} -Werte kleiner als 0,5 (Zhu et al. 2007a). Die Autoren mussten künstliche Fehlpaarungen in die SONDENSEQUENZEN einfügen um diese Spezifität zu erreichen. 94 % der 136, für die getesteten Varianten relevanten SONDENSÄTZE des ESBL-Chips, zeigten ebenfalls RI_{MM} -Werte unter 0,5. Auch im Vergleich zu anderen Microarray-Studien kann die Genotypisierung daher als sehr spezifisch bezeichnet werden. Der SONDENSÄTZE TEM 237.2 erklärt den Verzicht auf einen festen Grenzwert, der über die Verwendbarkeit eines SONDENSÄTZE entscheidet. TEM 237.2 wurde in dieser und vorangegangenen Arbeiten zur Genotypisierung von bla_{TEM} (Grimm 2005) bereits mehrfach überarbeitet, und besitzt wenig Potential für ein erneutes Sonden-Redesign. Da auf die Genotypisierung dieser wichtigen Position nicht verzichtet werden konnte, musste der SONDENSÄTZE trotz nicht optimaler Eigenschaften verwendet werden.

Für die Betrachtung der Reproduzierbarkeit des Assays konnte aufgrund der Genotypisierungsergebnisse der 60 klinischen Isolate auf eine große Anzahl von bis zu 38 Experimentwiederholungen zurückgegriffen werden. Diese als biologische Replikat bezeichneten Wiederholungen schließen Variationen in fast allen Schritten des Assays ein, darunter: Microarrays aus unterschiedlichen Herstellungschargen, markierte Ziel-DNA aus verschiedenen PCR-Reaktionen und damit verschiedenen Einbauraten und TEM/SHV-Mengenverhältnissen, verschiedene Fragmentierungsreaktionen, kleine Unterschiede in der für die Hybridisierung verwendeten Ziel-DNA-Menge und unterschiedliche Anwesenheit potentiell kreuzhybridisierender Ziel-DNA. Der Assay zeigte eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit, denn die relativen Intensitäten der Mismatch-Sonden variierten durchschnittlich um nur 3,3 % des jeweiligen Perfect Match-Signals ($RI_{MM} \pm 0,033$). Auch einzelne Maximalwerte von 14 bis 21 % schränkten das Diskriminierungsvermögen der betroffenen SONDENSÄTZE nicht entscheidend ein. Die Daten zur Reproduzierbarkeit der für

die Diskriminierung allelischer Varianten wichtigen relativen Signalintensitäten, können nur schwer mit anderen Microarray-Studien verglichen werden, da diese meist Reproduzierbarkeiten absoluter Signalintensitäten technischer Replikate betrachten (Yue et al. 2001). Es muss jedoch als positiv bewertet werden, dass aufgrund des Sondenkonzepts des beschriebenen Microarrays jeder Sondensatz in sich selbst eine Normalisierung erlaubt und so Qualitätsunterschiede der Arrayherstellung oder andere Parameter, die zu Schwankungen in den absoluten Signalintensitäten führen, offensichtlich unerheblich für die Identifizierung der Varianten sind.

Die herausragende Eigenschaft eines DNA-Microarrays ist seine Multiplexingkapazität. Diese betrifft nicht nur die gleichzeitige Analyse einer Vielzahl genetischer Merkmale eines Ziel-Gens, sondern auch die gleichzeitige Genotypisierung verschiedener Gene oder Gengruppen. ESBL-produzierende Enterobakterien produzieren oft mehrere β -Lactamasen (Essack et al. 2004; Paterson et al. 2003). Dabei kann es sich um mehrere ESBLs (Baraniak et al. 2002) oder auch Mischungen aus ESBLs und nicht-ESBLs (z. B. TEM-1 oder SHV-1) handeln. Für einen diagnostischen Assay ist es von immenser Bedeutung, diese Situationen unterscheiden zu können. Mit Hilfe des ESBL-Chips zur gleichzeitigen Genotypisierung von bla_{TEM} , bla_{SHV} und bla_{CTX-M} wurden in 41 der 60 getesteten klinischen Isolate mehr als nur ein bla -Gen nachgewiesen. Diese wurden zunächst mit Hilfe der Prozesskontrollen hoch spezifisch den drei β -Lactamase-Typen zugeordnet und anschließend identifiziert. Meist handelte es sich dabei um ein ESBL-Gen in der Gegenwart von ein oder zwei β -Lactamasen mit breitem (nicht erweitertem) Wirkspektrum, nämlich TEM-1 und SHV-1. In einem *Klebsiella*-Isolat (Iso-49) wurden zwei ESBLs unterschiedlichen Typs nachgewiesen (SHV-12 und CTX-M-15), in zwei *E. coli*-Isolaten (Iso-27 und Iso-59) zwei ESBLs des CTX-M-Typs (CTX-M-15 und CTX-M-14b).

Bei der gleichzeitigen Genotypisierung mehrerer bla -Zielgene werden Ziel-DNA-Mischungen hybridisiert. Die resultierenden Signalintensitäten müssen als sich überlagernde Signale interpretiert werden, welche auf spezifischen Hybridisierungsereignissen und Kreuzreaktivitäten der Sonden basieren. Das Ausmaß und der Einfluss der Kreuzreaktivitäten (oder Kreuzhybridisierungen) aller Sonden des ESBL-Chips wurden ausführlich untersucht. Kreuzreaktivitäten können prinzipiell auf nicht ausreichenden Spezifitäten einzelner Sonden oder auf der Homologie von Sequenzabschnitten der verschiedenen Zielgene beruhen. Tatsächlich zeigten die TEM- und SHV-Sonden untereinander häufiger Kreuzhybridisierungen als bei der Hybridisierung mit bla_{CTX-M} -Ziel-DNA. Diese Beobachtung entspricht den Verwandtschaftsverhältnissen der Klasse A β -Lactamasen (Hall und Barlow 2003). Die CTX-M-Sonden zeigten bei der gleichzeitigen Detektion von bla_{CTX-M} -Genvarianten verschiedener Gruppen Kreuzreaktivitäten, jedoch kaum bei der Hybridisierung mit bla_{TEM} - oder bla_{SHV} -Ziel-DNA. Insgesamt schränkten die Kreuzhybridisierungen die Leistungsfähigkeit des Arrays nur minimal ein. Relevante Auswirkungen waren nur bei zwei Sondensätzen zu erkennen (TEM 42 und CTX-M 52). Bei der Interpretation der ESBL-Chip-Ergebnisse muss lediglich die eingeschränkte Spezifität des Sondensatzes CTX-M 52 (Gruppe M9) bei der gleichzeitigen Genotypisierung von CTX-M- β -Lactamasegenen der Gruppen M1 und M9 beachtet werden.

Klinische Proben können auch Mischungen verschiedener Varianten desselben β -Lactamasegens enthalten. Dies wurde bereits für TEM- (Bradford et al. 1994) und SHV- β -Lactamasen beschrieben (M'Zali et al. 1998; Szabo et al. 1999). Dabei handelte es sich um jeweils zwei ESBLs desselben Typs (TEM-12 und TEM-10; SHV-7 und SHV-30). Aber auch Mischungen aus nicht-ESBL und ESBL-Varianten sind möglich. Ein verbreitetes Beispiel ist der oft heterozygote Genotyp ESBL-produzierender *K. pneumoniae*-Stämme bezüglich bla_{SHV} (Chang et al. 2001; Howard et al. 2002). Dabei besitzt der *K. pneumoniae*-Stamm ein chromosomal oder plasmidkodiertes bla_{SHV-1} -Wildtypallel und ein weiteres plasmidkodiertes bla_{SHV-X} -ESBL-Allel. Diese Situation ist mit Methoden, die lediglich bestimmte bla -Gene detektieren können, nicht aufzulösen. Selbst die Sequenzierung kann, aufgrund von Unstimmigkeiten an den relevanten Positionen im Elektropherogramm,

heterozygote Genotypen nur mit schwankender Spezifität und Sensitivität nachweisen (Nickerson et al. 1997).

Die hier verwendete allelspezifische Hybridisierung hat jedoch ein großes Potential, gemischte Genotypen nachzuweisen. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit in sieben *Klebsiella*-Isolaten bla_{SHV-12} (ESBL) in der Gegenwart von bla_{SHV-1} (nicht-ESBL) nachgewiesen. Die relevanten SONDENSÄTZE des Microarrays konnten dabei eindeutig zwischen dem homozygoten (SHV-1 oder SHV-12) und heterozygoten (SHV-12 und SHV-1) Fall unterscheiden (siehe 3.1.5.6). Beim Nachweis von Mischungen zweier unbekannter Genvarianten ist jedoch anzumerken, dass in erste Linie Mischungen an den einzelnen Mutationsorten detektiert werden. Theoretisch können die gemischten Signale der SONDENSÄTZE für die Positionen 35 und 238/240 durch Mischungen von bla_{SHV-12} und bla_{SHV-1} oder bla_{SHV-5} und bla_{SHV-11} erklärt werden. Eine Zuordnung bestimmter Signale zu einer Variante ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich. So zeigten bei allen sechs Mischungen stets die für SHV-12 spezifischen Sonden der beiden relevanten Positionen die größten Signalintensitäten. Der detektierte Genotyp wurde daher als Mischung von bla_{SHV-12} als vorherrschendes Allel in Gegenwart von bla_{SHV-1} betrachtet. Da für die Amplifizierung der bla_{SHV} -Gene extrahierte Plasmid-DNA verwendet wurde und nicht bei allen *K. pneumoniae*-Isolaten bla_{SHV-1} detektiert wurde, ist eine plasmidische Lokalisation der nachgewiesenen bla_{SHV-1} -Wildtypallele wahrscheinlich. Ein chromosomaler Ursprung kann aber aufgrund einer möglichen Verunreinigung der extrahierten DNA mit genomischer DNA nicht vollständig ausgeschlossen werden (Howard et al. 2002). Auch der Nachweis einer Mischung aus bla_{CTX-M} -Genen der Gruppen M1 (CTX-M-15) und M9 (CTX-M-14b) mit Hilfe der Gruppenspezifischen SONDENSÄTZE des CTX-M-Moduls war eindeutig (siehe 3.1.5.6).

Die Analyse der Signalintensitäten der SONDENSÄTZE SHV 35 und SHV 238/240 deutet auf Schwankungen im Mengenverhältnis der beiden bla_{SHV} -Allele in den realen Proben hin, was jedoch zu keinerlei Komplikationen bei der Detektion führte. Eine Sensitivitäts-Bestimmung des Nachweises von gemischten Genotypen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, müsste für jeden einzelnen SONDENSATZ der verschiedenen Chipmodule bestimmt werden, bis zu welchem Überschuss einer allelischen Variante eine zweite Variante detektierbar bleibt. Für die Generierung dieser Daten war weder das vorhandene Probematerial noch der Zeitrahmen der Arbeit ausreichend. In der vorangegangenen Studie zur Entwicklung des Microarrays zur Genotypisierung von bla_{TEM} wurden jedoch exemplarisch verschiedene Mischungen aus bla_{TEM-8} - und $bla_{TEM-116}$ -Ziel-DNA hybridisiert (Grimm 2005). Manche der relevanten SONDENSÄTZE konnten die Ziel-DNA bis zu einem zehnfachen Überschuss einer Variante als Mischung identifizieren, andere nur bis zu einem Verhältnis von 1:5. Weitere DNA-Microarrays konnten in ähnlichen Versuchsreihen Mischungen aus zwei verschiedenen Allelen bis zu einem Verhältnis von ebenfalls 1:10 (Yu et al. 2007), 1:20 (Lindroos et al. 2002) oder sogar 1:50 (Barl 2007) nachweisen.

Ein wichtiges Leistungsmerkmal eines Assays ist seine Sensitivität. Für den in dieser Arbeit beschriebenen Assay ist nicht die Nachweisgrenze des entwickelten DNA-Microarrays limitierend, sondern die der Präanalytik, im Besonderen die Empfindlichkeit der PCR. Ist die Amplifikation der *Targets* erfolgreich, wird in jedem Fall genügend Ziel-DNA für eine eindeutige Genotypisierung produziert. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung des DNA-Microarrays und dessen Optimierung hinsichtlich biologischer Abdeckung und Diskriminierung der Genvarianten, nicht jedoch die Optimierung der Präanalytik hinsichtlich ihrer Sensitivität. Vielmehr wurde Wert auf Robustheit und Wirtschaftlichkeit bezüglich Reagenzien und Probenmaterial gelegt (siehe 3.1.1). Zukünftige Arbeiten sollten sich daher mit den Nachweisgrenzen der Präanalytikschritte auseinandersetzen. Neben der Sensitivität der PCR bezüglich der absoluten DNA-Menge, die benötigt wird, oder welches Verhältnis von Ziel-DNA zu Nicht-Ziel-DNA analysierbar bleibt, sind dabei Nachweisgrenzen der PCR in Kombination mit der DNA-Isolation aus unterschiedlichem klinischen Probematerial interessant. Vorangegangene Arbeiten, die ähnliche Microarray-basierte Assays nutzten, beobachteten untere Nachweisgrenzen von

Ausgangs-DNA-Mengen für die eingesetzten PCR-Protokolle, die ca. 1000 Genomäquivalenten (Barl et al. 2008) oder 100 CFUs (Yu et al. 2007) entsprachen. Übertragbar sind diese Ergebnisse jedoch nicht, da in diese Arbeiten deutlich kleinere Genabschnitte amplifiziert wurden.

Eines der Hauptargumente für die Entwicklung genotypischer Verfahren zur Resistenztestung ist das große Potential dieser Verfahren zur Beschleunigung der Diagnostik. Das in dieser Arbeit entwickelte Microarray-basierte Verfahren lieferte in ca. 4 bis 4,5 Stunden nach DNA-Isolation ausgewertete Ergebnisse. Die DNA-Isolation kann normalerweise innerhalb maximal einer Stunde erfolgen. Die Isolation bakterieller DNA aus Urin kann z. B. in 45 min erfolgen (*Urine Bacteria DNA Isolation Kit*, Norgen Biotek Corp., Thorold, Kanada). Andere Hersteller geben für die DNA-Extraktion aus Blut ca. 30 - 40 min (www.genepost.com) bzw. 10 - 20 min nach Lyse an (www.genepost.com bzw. www.hain-diagnostika.de). Dass in der DNA-Extraktion weiteres Potential zur Zeitersparnis steckt, zeigt das *nexttec DNA Isolation System* (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland), das zur Aufreinigung von Plasmid-DNA und genomischer DNA aus Bakterien, Zellen, Gewebe und Blut geeignet ist. Die Dauer wird vom Hersteller mit ca. 4 min. (nach Lyse) angegeben. Insgesamt kann die Genotypisierung einer klinischen Probe also in ca. 5 bis 5,5 Stunden erfolgen und ist damit deutlich schneller als die phänotypische Charakterisierung. Inwiefern weitere Präanalytikschritte, wie z. B. die (speziesspezifische) Aufkonzentrierung von Zellen oder DNA-Spezies, nötig sind, stand nicht im Fokus dieser Arbeit und muss noch abschließend geklärt werden. Welche Schritte des beschriebenen Verfahrens Potential für eine weitere Reduzierung der Assaydauer besitzen, soll im Folgenden erläutert werden.

Das wahrscheinlich größte Potential zur Zeitersparnis bieten die Amplifikationsstrategien. So wurde die Dauer des Verfahrens auf der Basis einer parallelen Amplifikation der möglichen *bla_{CTX-M}*-Gene angegeben, da ein vorgeschaltetes Screening den Nachweis verzögert. Durch die Verkürzung und die Reduktion der Zyklen der verwendeten PCR-Protokolle, konnte in Studien die Produktion einer ausreichender Menge an Ziel-DNA für die Hybridisierung mit 50 ng genomischem bzw. 45 ng plasmidischem DNA-*Template*, von ca. 1,5 Stunden auf ca. 20 - 30 min reduziert werden (Barl 2007; Henn 2006). Solche Schritte müssen jedoch immer in Kombination mit der Sensitivität des Assays betrachtet werden. Die ca. 30 min für die Fragmentierung der markierten Ziel-DNA können nicht eingespart werden, da sich die Fragmentierung als essentiell für das auf allelspezifischer Hybridisierung basierende Array-Konzept erwiesen hat (Barl et al. 2008; Grimm 2005). Bei Verzicht auf eine Fragmentierung kommt es zu starken Unterschieden der Hybridisierungseffizienzen der SONDENSÄTZE, in Abhängigkeit der von der jeweiligen Sondenposition (Peytavi et al. 2005). Auch die weiteren Assay-Schritte Hybridisierung, Waschen und Auslesen des Hybridisierungsergebnisses bieten nur noch wenige Möglichkeiten zur Zeitersparnis. Die Hybridisierung (1 h, bei gleichzeitiger Durchmischung der Hybridisierungslösung), das stringente Waschen und die Trocknung des *Slides* wurde automatisiert in einer Hybridisierungsstation durchgeführt, mit einer Dauer von 90 min. Die prinzipielle Verkürzung der Hybridisierungsdauer auf unter eine Stunde konnte zwar für den TEM-Prototypen gezeigt werden (Grimm 2005), jedoch nicht ohne Verschlechterung der Diskriminierung. Auch das Waschprotokoll, das aktuell ca. 15 min in Anspruch nimmt, bietet kaum noch Potential für eine Reduktion der Assaydauer.

4.4. AmpC-Chipmodul

Neben den plasmidkodierte Ambler Klasse A β -Lactamasen (z. B. TEM, SHV und CTX-M) spielen mit zunehmender Häufigkeit auch Enzyme der Klasse C (AmpC) eine Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen gegenüber β -Lactamen mit breitem Wirkspektrum in gramnegativen Bakterien. In Hinblick auf die weitere Verbreitung der *ampC*-Resistenzgene, sind vor allem die plasmidkodierte *ampC*-Gene, die klinische Resistenz bei Spezies vermitteln, die normalerweise keine β -Lactamasen dieses Typs produzieren (z. B.

Klebsiella spp., *Salomonella* spp.) oder ihr eigenes *ampC*-Gen nur schwach exprimieren (z. B. *E. coli*), relevant. Die vermittelte Resistenz schließt dabei sogar die β -Lactamgruppe der Cephamycine ein, die von Klasse A ESBLs in der Regel schlecht gespalten werden, und führt bei Behandlungen mit Cephalosporinen zu Therapiefehlern (Pai et al. 2004). Da AmpC- β -Lactamasen unempfindlich gegenüber Inhibitoren sind, bereitet der phänotypische Nachweis dieses Resistenzmechanismus und die Abgrenzung von ESBL-assoziiierter Resistenz große Probleme. Einige der Probleme des Nachweises sind den Problemen der phänotypischen ESBL-Detektion sehr ähnlich. So vermitteln nicht alle AmpCs MHK-Werte, die nach CLSI-Richtlinien als resistent zu bewerten sind, und auch der Inoculum-Effekt wurde für einige Vertreter der plasmidkodierten AmpCs beschrieben (Kang et al. 2004; Queenan et al. 2004). Die Unempfindlichkeit gegenüber Inhibitoren führt nach einem positiven Eingangsscreening zu negativen ESBL-Bestätigungstests, und die MHK-Werte für Cephalosporine werden nicht korrigiert. Besonders heikel ist die Maskierung von Synergie-Effekten durch die gleichzeitige Produktion eines AmpC-Enzyms und einer ESBL. Dies führt ebenfalls zu negativen Bestätigungstests. Zusätzliche AmpC-Bestätigungstests (Hemmung durch Borsäure) sind nicht standardisiert und aufwändig (Doi und Paterson 2007). Die genotypische Detektion und Identifikation plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen ist also sinnvoll, mehr noch, wenn sie kombiniert wird mit einer umfangreichen Genotypisierung von ESBL-assoziierten Genen.

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Microarray-Prototyp für den Nachweis und die Identifikation von 39 Varianten plasmidkodierter AmpC- β -Lactamasen der sechs verschiedenen Hauptgruppen entwickelt. Der Array kann aufgrund seines Konzepts zu einem späteren Zeitpunkt als Chipmodul in den ESBL-Chip integriert werden, und deckt aktuell ca. 76 % aller bisher veröffentlichten plasmidkodierten *ampC*-Allele ab. Dieser Wert kommt vor allem durch die Beschreibung neuer Varianten des *C. freundii*-Typs zustande (www.lahey.org/studies/). Für eine vollständige Abdeckung müssten insgesamt 13 weitere SNP-Sondensätze in das Layout integriert werden. Die klinische Relevanz der zur Identifikation der Varianten ausgewählten Substitutionen ist meist unbekannt. Der Aminosäureaustausch Ile315Ser wurde jedoch mit einem erhöhten MHK-Wert eines *K. pneumoniae*-Isolates gegenüber Cefepim assoziiert (Wachino et al. 2006) und wird vom aktuellen Sonden-Portfolio abgedeckt. Die Evolution der AmpC- β -Lactamasen ist nicht mit der Evolution der klassischen Klasse A β -Lactamasen vergleichbar, da es bisher kaum zu einer Ausweitung des bereits breiten Substratspektrums gekommen ist. Die Identifizierung der verschiedenen transferierbaren *ampC*-Resistenzgene ist aber aus epidemiologischen Gesichtspunkten von großer Bedeutung.

Der Array wurde mit *ampC*-Genen der *C. freundii*-Gruppe validiert. Für die Validierung mit *ampC*-Genen der restlichen fünf Gruppen stand kein Probenmaterial zur Verfügung. Diese musste daher auf nachfolgende Arbeiten verschoben werden. Die Entwicklung von universellen Primern für die sechs Hauptgruppen ist aufgrund der niedrigen Homologie der Genfamilien nicht möglich. Es wurde daher zunächst ein PCR-Protokoll zur Amplifizierung und Markierung von *ampC*-Genen dieser Gruppe etabliert. Das PCR-Protokoll verwendet dabei die gleichen Bedingungen wie die TEM/SHV-Dualplex-PCR (Anlagerungstemperatur von 54 °C, Konzentrationen usw.) und kann daher parallel zu dieser PCR und den CTX-M-PCRs durchgeführt werden. Für die weitere Validierung müssen Amplifikationsstrategien für die anderen Gruppen entwickelt werden. Auch hier wäre eine Amplifikation ausreichend großer Genabschnitte in einem Multiplexformat wünschenswert. Die von Perez-Perez und Hanson beschriebene Multiplex-PCR zum Nachweis plasmidkodierter *ampC*-Gene kann dies nicht leisten (Perez-Perez und Hanson 2002).

Die Leistungsmerkmale des AmpC-Arrays und die Leistungsfähigkeit einzelner Sondensätze konnten noch nicht abschließend bewertet werden. Für die Hybridisierung wurde eine Hybridisierungstemperatur von 45 °C und 6x SPPE als Hybridisierungslösung verwendet. Diese Bedingungen entsprachen den ursprünglichen Testbedingungen der TEM-, SHV-, und CTX-M-Microarrayprototypen. Bei einem Wechsel zu den für diese Chips optimierten

stringenteren Bedingungen, ist mit einer Verbesserung der Diskriminierungsvermögen der AmpC-Sondensätze zu rechnen. Auch der Einfluss einer beobachteten Kreuzhybridisierung kann erst nach einer weiteren Validierung eingeschätzt werden.

Die AmpC-Sondensätze, die für die Unterscheidung der getesteten Varianten relevant waren, zeigten bei der Analyse der Sonden auf der Basis der verwendeten Bedingungen hervorragende Eigenschaften. Zusätzlich kann die unter 4.3.3 begonnene Diskussion hinsichtlich der Korrelation der *in vitro* berechneten Sekundärstrukturen und des Verhaltens der entsprechenden Sonden unter experimentellen Bedingungen erweitert werden. Das Verhalten des Sondensatzes AmpC 180 korrelierte eindeutig mit einem starken Dimer der C-Sonde dieses Satzes. Interessanterweise kann die C-Sonde des Sondensatzes 221.1 eine ähnlich stabile Dimer-Struktur ausbilden. Dies ist relevant bei der Hybridisierung mit z. B. *bla*_{CMY-12}. Die Funktion dieses Sondensatzes sollte also mit weiterem Referenzmaterial getestet werden. Ein weiterer Aspekt des Sondendesigns betrifft das unterschiedliche Verhalten eines Sondensatzes bei Hybridisierung mit zwei verschiedenen allelischen Varianten. Diese Eigenschaft konnte bei den Sondensätzen AmpC 171 und AmpC 221.1 beobachtet werden, und kann mit den unterschiedlichen Schmelztemperaturen der vier verschiedenen Sonden innerhalb eines Sondensatzes begründet werden.

Die Validierung des AmpC-Microarray-Prototyps ist noch nicht abgeschlossen. Nichtsdestotrotz steht ein umfassendes Sonden-Portfolio für die Erweiterung des integrierten ESBL-Chips bereit.

4.5. OXA-Chipmodul

Auch innerhalb der sehr heterogenen Ambler Klasse D, den Oxacillinasen (OXA), gibt es Vertreter, die im Gegensatz zum eigentlich engen hydrolytischen Spektrum dieser Enzym-Klasse ein erweitertes Spektrum zeigen und klinische Resistenz gegenüber Cefotaxim und Ceftriaxon vermitteln (Naas und Nordmann 1999). Die genetische Lokalisation dieser als OXA-ESBLs bezeichneten β -Lactamasen ist nicht einheitlich, doch meistens liegen die *bla*_{OXA}-Gene auf großen transferierbaren Plasmiden und können sich über verschiedene Spezies hinweg verbreiten. Da die meisten OXA- β -Lactamasen nur schwach durch β -Lactamase-Inhibitoren gehemmt werden, ergeben sich für den phänotypischen Nachweis analoge Schwierigkeiten, wie beim Nachweis nicht hemmbarer AmpCs (siehe 4.4). Betrachtet man das von Doi und Paterson vorgeschlagene Vorgehen zum phänotypischen Nachweis von β -Lactamasen verschiedener Klassen (Abbildung 1-3), so liefert dieses erst nach Ausschluss aller anderen Resistenzmechanismen die Möglichkeit einer OXA-assoziierten Resistenz. Nur ein genotypischer Nachweis von *bla*_{OXA}-Genen kann in angemessener Zeit zur Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus beitragen.

Eine weitere Gruppe von OXA- β -Lactamasen zeichnet sich durch Carbapenemase-Aktivität aus und spielt eine besondere Rolle bei der Ausbildung von Carbapenem-Resistenz bei *A. baumannii* und *P. aeruginosa*. Da besonders bei *A. baumannii* Carbapeneme die Antibiotika der Wahl sind, stellt die Ausbreitung von Carbapenemase-positiven, oft multiresistenten *Acinetobacter*-Stämmen ein ernstes therapeutisches Problem dar. Die OXA-Carbapenemasen werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt und sind meist chromosomal codiert. Dies gilt jedoch nicht für OXA-23 und OXA-58, deren plasmidkodierte Lokalisation zu einer weiten Verbreitung beigetragen hat. Phänotypische Methoden können die oft komplexe Situation in multiresistenten *A. baumannii* nicht auflösen. Zusätzlich ist die genaue Rolle der für *A. baumannii* intrinsischen *bla*_{OXA-51}-ähnlichen Gene (Untergruppe 3 der Gruppe V) noch nicht abschließend geklärt, da diese meist nur schwache Carbapenem-Hydrolyseraten zeigen. Aktuell veröffentlichte Studien identifizierten eine Vielzahl allelischer Varianten dieser *bla*_{OXA}-Gene (Evans et al. 2007; Evans et al. 2008), und der Zusammenhang einzelner Substitutionen mit dem Ausmaß der vermittelten Resistenz wird

aktuell untersucht. Die genotypische Analyse klinischer *A. baumannii*-Isolate bezüglich OXA- β -Lactamasen ist daher eine interessante Option für die Diagnostik und die Epidemiologie der Carbapenem-Resistenz bei *A. baumannii*.

Für den Nachweis und die Identifikation von sowohl OXA-ESBLs als auch OXA-Carbapenemasen, wurde im Rahmen des GenoMik-Projekts am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart ein DNA-Microarray-Prototyp entwickelt und mit Vertretern der OXA Gruppen I und II (relevant für OXA-ESBL) validiert. Durch die Testung des OXA-Chips mit Vertretern der Untergruppen 1 bis 3 der OXA-Gruppe V (OXA-Carbapenemasen), konnte in dieser Arbeit die Evaluierung des aktuellen Sondensatzes erfolgreich abgeschlossen werden. Für die Validierung wurden verblindete klinische Proben untersucht. Alle Varianten konnten korrekt identifiziert werden und dabei hoch spezifisch der Gruppe V und den verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden.

Während die Amplifikation der OXA-ESBL relevanten bla_{OXA} -Gene der Gruppen I und II auf die PCR-Protokolle zur Vervielfältigung der bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} und amp^{CIT} abgestimmt wurde (Henn 2006), stand für die verschiedenen bla_{OXA} -Gengruppen der Gruppe V die Produktion von Ziel-DNA im Vordergrund. Für die Amplifikation und Markierung wurden daher eine Reihe bereits beschriebener PCR-Protokolle etabliert. Diese gewährleisteten die Abdeckung aller relevanten Positionen (Heritier et al. 2005; Woodford et al. 2006a). Da auch bei der Entwicklung des OXA-Chips die Kompatibilität des Arrays eine wichtige Rolle spielte und die Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für den ESBL-Chip bereits abgeschlossen waren, wurden alle Hybridisierungen unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Eine Beurteilung der einzelnen Sondensätze war daher möglich.

Die einzelnen Sondensätze zeigten gute Spezifitäten. Einige Sondensätze zeigten jedoch nach der Hybridisierung mit einzelnen Varianten niedrige Signalintensitäten und in der Folge nicht optimale Diskriminierungen. Die Ursache hierfür basierte auf zusätzlichen Fehlpaarungen zwischen dem hybridisierten bla_{OXA} -Genallel und den Sonden des betroffenen Sondensatzes. Diese waren im Gegensatz zu Fehlpaarungen, die als Mittel des Sondendesigns eingesetzt wurden, nicht gewollt und basieren auf der niedrigen Homologie der verschiedenen Genvarianten in diesem Bereich. Diese Problematik kann daher nicht vollständig umgangen werden, und die Optionen für ein Sonden-Redesign sind limitiert. Aufgrund des hervorragenden Hintergrunds der Experimente konnten dennoch alle Sondensätze ausgewertet werden und lieferten korrekte Genotypisierungsergebnisse. Die Qualität des Assays wurde also nur bedingt eingeschränkt. In einer anderen Arbeit hatten stille Mutationen, die zu Fehlpaarungen führten, ebenfalls keine einschränkenden Auswirkungen (Bartl 2007). Die Sondensätze OXA 3.24, OXA 2.142 und OXA 2.257 wurden während der Auswertung auf Sondensätze mit nur zwei Sonden (WT, MUT) reduziert. Dies schränkt jedoch den Informationsgehalt des Arrays für diese Positionen ein. Ein Redesign dieser Sondensätze ist daher sinnvoll.

Bei der Bewertung der aktuellen Abdeckung des OXA-Arrays sind zwei Punkte relevant. Ersten wurde OXA-58 zum Zeitpunkt des Sonden-Designs noch nicht als Untergruppe 4 der Gruppe V klassifiziert, und zweitens wurden bei neueren Analysen chromosomaler bla_{OXA-51} -ähnlichen Gene (Untergruppe 3) eine Vielzahl weiterer allelischer Varianten dieser bla_{OXA} -Gene beschrieben. Die Abdeckung für die Untergruppe 3 der Gruppe V liegt daher aktuell nur bei ca. 25 %. Der OXA-Chip sollte daher mit Sonden zur Detektion von OXA-58 und zur Identifikation weiterer Polymorphismen in bla_{OXA-51} -ähnlichen Genen erweitert werden.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen ist die Validierung der aktuellen Version des OXA-Microarrays abgeschlossen. Die Validierung des Chips mit bla_{OXA} -Genen der Gruppen I und II sollte unter optimierten Bedingungen überprüft werden. Mit der Erweiterung des ESBL-Chips um Sondensätze für den Nachweis OXA-ESBL relevanter Gruppen, Untergruppen und

Varianten, kann die Microarray-basierte ESBL-Detektion in gramnegativen Enterobakterien noch umfangreicher gestaltet werden.

4.6. Fazit und Ausblick

Der zentrale Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung einer DNA-Microarray-basierten genotypischen Methode, die einen schnellen Nachweis und eine eindeutige Identifikation der drei häufigsten ESBL-assoziierten Resistenzgenfamilien (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M}) und ihrer Genvarianten erlaubt. Diese sollte ein attraktives Werkzeug für die Resistenztestung in der klinischen Mikrobiologie und für epidemiologische Fragestellungen darstellen. Die schnellen Rückschlüsse auf mögliche Resistenzen eines Infektionserregers, die ein solches Verfahren zulässt, könnten zu einem adäquateren Antibiotika-Gebrauch beitragen. Dieser hätte positive therapeutische und wirtschaftliche Effekte, und würde aufgrund eines verringerten Selektionsdrucks die weitere Resistenzverbreitung verlangsamen. Der hier entwickelte Assay erfüllt aufgrund einer Dauer von 4,5 h, einer hohen Abdeckung bekannten *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}- und *bla*_{CTX-M}-Genvarianten, einer guten Genotyp-Phänotyp-Korrelation und einer robusten Identifikation von sogar Mischungen von Varianten der gleichen Genfamilie, alle Ansprüche an ein solches Verfahren. Die Integration der bereits entwickelten und validierten DNA-Microarrays zur Identifikation plasmidkodierter AmpC- und verschiedener OXA- β -Lactamasen wird den Informationsgehalt des Assays in Zukunft weiter erhöhen. Damit würde der Chip die mit Abstand am häufigsten in Enterobakterien nachgewiesenen Resistenzgene, die mit β -Lactam-Resistenz assoziiert werden, umfassen. Eine weitere Integration von Sondensätzen zur Genotypisierung seltenerer Gene ist jederzeit möglich.

Der klinische Nutzen des in dieser Arbeit vorgestellten Verfahrens wird bei der Betrachtung klinischer Studien, die retrospektiv verschiedene ESBL-Varianten mit dem Behandlungserfolg schwerer Infektionen korrelieren, deutlich. In der Regel versagte die empirische Behandlung des ESBL-produzierenden Erregers mit einem Drittgenerations-Cephalosporin. Die Verfügbarkeit der Ergebnisse des hier beschriebenen Microarrays während der Therapie-Entscheidung hätte vermutlich zum Einsatz eines Carbapenems und damit zu einer adäquaten Therapie geführt. Allerdings sind Studien, die Daten hinsichtlich des Nutzens genotypischer Methoden zur Resistenztestung und den therapeutischen und wirtschaftlichen Folgen ihres Einsatzes erheben, selten und werden in Zukunft dringend benötigt. Für die Umsetzung in ein kommerzielles Produkt sind noch weitere Schritte vonnöten, die die Handhabung und Wirtschaftlichkeit arraybasierter molekularer Verfahren zur Erregerdiagnostik weiter verbessern. Interessante Ansätze liefern hier Entwicklungen aus der Mikrofluidik. Es ist zu erwarten, dass Systeme, die die Microarrayanalyse und verschiedene Schritte der Probenaufarbeitung und Präanalytik integrieren, in Zukunft diese Verfahren für die Anwendung in der klinischen Routine entscheidend vereinfachen.

5. Literaturverzeichnis

1. Adler,H., Fenner,L., Walter,P., Hohler,D., Schultheiss,E., Oezcan,S., Frei,R., 2008. Plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 457-458.
2. Afzal-Shah,M., Woodford,N., Livermore,D.M., 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 583-588.
3. Alvarez,M., Tran,J.H., Chow,N., Jacoby,G.A., 2004. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 533-537.
4. Ambler,R.P., Coulson,A.F., Frere,J.M., Ghuysen,J.M., Joris,B., Forsman,M., Levesque,R.C., Tiraby,G., Waley,S.G., 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 276 (Pt 1), 269-270.
5. Andes,D., Craig,W.A., 2005. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 Suppl 6, 10-17.
6. Antwerpen,M.H., Schellhase,M., Ehrentreich-Forster,E., Bier,F., Witte,W., Nubel,U., 2007. DNA microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and closely related *Bacillus cereus*. *Mol. Cell Probes* 21, 152-160.
7. Arlet,G., Brami,G., Decre,D., Flipppo,A., Gaillot,O., Lagrange,P.H., Philippon,A., 1995. Molecular Characterization by Pcr-Restriction Fragment Length Polymorphism of Tem Beta-Lactamases. *Fems Microbiology Letters* 134, 203-208.
8. Babic,M., Hujer,A.M., Bonomo,R.A., 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat.* 9, 142-156.
9. Babini,G.S., Livermore,D.M., 2000. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 183-189.
10. Bae,I.K., Lee,B.H., Hwang,H.Y., Jeong,S.H., Hong,S.G., Chang,C.L., Kwak,H.S., Kim,H.J., Youn,H., 2006. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 315-319.
11. Bagge,N., Ciofu,O., Hentzer,M., Campbell,J.I., Givskov,M., Hoiby,N., 2002. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3406-3411.
12. Baner,J., Isaksson,A., Waldenstrom,E., Jarvius,J., Landegren,U., Nilsson,M., 2003. Parallel gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, e103.

13. Baraniak,A., Sadowy,E., Hryniewicz,W., Gniadkowski,M., 2002. Two different extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing salmonella isolates in Poland. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1095-1097.
14. Barl,T. DNA-Microarrays zur Identifizierung von pathoadaptiven Mutationen und Antibiotikaresistenzen in extraintestinal pathogenen *Escherichia coli* (ExPEC). 2007. Institute for Technical Biochemistry, University of Stuttgart. Thesis/Dissertation.
15. Barl,T., Dobrindt,U., Yu,X., Katcoff,D.J., Sompolinsky,D., Bonacorsi,S., Hacker,J., Bachmann,T.T., 2008. Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenic potential of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 272-277.
16. Barlow,M., Hall,B.G., 2002. Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1190-1198.
17. Batchelor,M., Hopkins,K.L., Liebana,E., Slickers,P., Ehricht,R., Mafura,M., Aarestrup,F., Mevius,D., Clifton-Hadley,F.A., Woodward,M.J., Davies,R.H., Threlfall,E.J., Anjum,M.F., 2008. Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*.
18. Bauernfeind,A., Chong,Y., Schweighart,S., 1989. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 17, 316-321.
19. Bauernfeind,A., Grimm,H., Schweighart,S., 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18, 294-298.
20. Bauernfeind,A., Stemplinger,I., Jungwirth,R., Wilhelm,R., Chong,Y., 1996. Comparative characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other beta-lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1926-1930.
21. Bergogne-Berezin,E., Towner,K.J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 148-165.
22. Birkett,C.I., Ludlam,H.A., Woodford,N., Brown,D.F., Brown,N.M., Roberts,M.T., Milner,N., Curran,M.D., 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J. Med. Microbiol.* 56, 52-55.
23. Bodrossy,L., 2003. Diagnostic oligonucleotide microarrays for microbiology. In: E.Blalock (Ed.), *A Beginner's Guide to Microarrays*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 43-92.
24. Bonnet,R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1-14.
25. Bou,G., Oliver,A., Martinez-Beltran,J., 2000. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1556-1561.

26. Boyaci,I.H., Aguilar,Z.P., Hossain,M., Halsall,H.B., Seliskar,C.J., Heineman,W.R., 2005. Amperometric determination of live *Escherichia coli* using antibody-coated paramagnetic beads. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1234-1241.
27. Bradford,P.A., Cherubin,C.E., Idemyor,V., Rasmussen,B.A., Bush,K., 1994. Multiply Resistant *Klebsiella-Pneumoniae* Strains from 2 Chicago Hospitals - Identification of the Extended-Spectrum Tem-12 and Tem-10 Cefazidime-Hydrolyzing Beta-Lactamases in A Single Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 761-766.
28. Brown,S., Amyes,S., 2006. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1-3.
29. Brown,S., Amyes,S.G., 2005. The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 326-329.
30. Brown,S., Young,H.K., Amyes,S.G., 2005. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 15-23.
31. Bruant,G., Maynard,C., Bekal,S., Gaucher,I., Masson,L., Brousseau,R., Harel,J., 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3780-3784.
32. Brun-Buisson,C., Legrand,P., Philippon,A., Montravers,F., Ansquer,M., Duval,J., 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 2, 302-306.
33. Bush,K., 1989a. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 264-270.
34. Bush,K., 1989b. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 271-276.
35. Bush,K., 2008. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 134-143.
36. Bush,K., Jacoby,G.A., Medeiros,A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
37. Buynak,J.D., 2007. Cutting and stitching: the cross-linking of peptidoglycan in the assembly of the bacterial cell wall. *ACS Chem. Biol.* 2, 602-605.
38. Campa,D., Tavanti,A., Gemignani,F., Mogavero,C.S., Bellini,I., Bottari,F., Barale,R., Landi,S., Senesi,S., 2008. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J. Clin. Microbiol.* 46, 909-915.
39. Canton,R., Morosini,M.I., Martin,O., de la Maza,S., De la Pedrosa,E.G.G., 2008a. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 53-62.

40. Canton,R., Novais,A., Valverde,A., Machado,E., Peixe,L., Baquero,F., Coque,T.M., 2008b. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 144-153.
41. Cantu,C., III, Palzkill,T., 1998. The role of residue 238 of TEM-1 beta-lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics. *J. Biol. Chem.* 273, 26603-26609.
42. Caroff,N., Espaze,E., Gautreau,D., Richet,H., Reynaud,A., 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 783-788.
43. Cartelle,M., del Mar,T.M., Molina,F., Moure,R., Villanueva,R., Bou,G., 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2308-2313.
44. Cassone,M., D'Andrea,M.M., Iannelli,F., Oggioni,M.R., Rossolini,G.M., Pozzi,G., 2006. DNA microarray for detection of macrolide resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2038-2041.
45. Cassone,M., Del Grosso,M., Pantosti,A., Giordano,A., Pozzi,G., 2008. Detection of genetic elements carrying glycopeptide resistance clusters in *Enterococcus* by DNA microarrays. *Mol. Cell Probes* 22, 162-167.
46. Chaibi,E.B., Sirot,D., Paul,G., Labia,R., 1999. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 447-458.
47. Chain,E., Florey,H.W., Gardner,A.D., Heatly,N.G., Jennings,M.A., Orr-Ewing,J., Sanders,A.G., 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancetti* 226-228.
48. Chanawong,A., M'Zali,F.H., Heritage,J., Lulitanond,A., Hawkey,P.M., 2000. Characterisation of extended-spectrum beta-lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Fems Microbiology Letters* 184, 85-89.
49. Chang,F.Y., Siu,L.K., Fung,C.P., Huang,M.H., Ho,M., 2001. Diversity of SHV and TEM beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in Northern Taiwan and two novel beta-lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2407-2413.
50. Chen,S., Zhao,S., McDermott,P.F., Schroeder,C.M., White,D.G., Meng,J., 2005. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell Probes* 19, 195-201.
51. Cheung,V.G., Morley,M., Aguilar,F., Massimi,A., Kucherlapati,R., Childs,G., 1999. Making and reading microarrays. *Nature Genetics* 21, 15-9.
52. Chizhikov,V., Wagner,M., Ivshina,A., Hoshino,Y., Kapikian,A.Z., Chumakov,K., 2002. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2398-2407.

53. Cleven,B.E., Palka-Santini,M., Gielen,J., Meembor,S., Kronke,M., Krut,O., 2006. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin. Microbiol.* 44, 2389-2397.
54. CLSI, 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement 29, M100-S19.
55. Coque,T.M., Baquero,F., Canton,R., 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro. Surveill* 13.
56. Cormican,M.G., Marshall,S.A., Jones,R.N., 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1880-1884.
57. Cornaglia,G., Garau,J., Livermore,D.M., 2008. Living with ESBLs. Introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 1-2.
58. Couture,F., Lachapelle,J., Levesque,R.C., 1992. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases. *Mol Microbiol.* 6, 1693-1705.
59. D'Andrea,M.M., Nucleo,E., Luzzaro,F., Giani,T., Migliavacca,R., Vailati,F., Kroumova,V., Pagani,L., Rossolini,G.M., 2006. CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 618-624.
60. Dalla-Costa,L.M., Coelho,J.M., Souza,H.A., Castro,M.E., Stier,C.J., Bragagnolo,K.L., Rea-Neto,A., Pentead-Filho,S.R., Livermore,D.M., Woodford,N., 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3403-3406.
61. Damjanova,I., Toth,A., Paszti,J., Hajbel-Vekony,G., Jakab,M., Berta,J., Milch,H., Fuzi,M., 2008. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 978-985.
62. Dell'Atti,D., Tombelli,S., Minunni,M., Mascini,M., 2006. Detection of clinically relevant point mutations by a novel piezoelectric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1876-1879.
63. Delmas,J., Robin,F., Bittar,F., Chanal,C., Bonnet,R., 2005. Unexpected enzyme TEM-126: role of mutation Asp179Glu. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4280-4287.
64. Doi,Y., Paterson,D.L., 2007. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 191-197.
65. Donald,H.M., Scaife,W., Amyes,S.G.B., Young,H.K., 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 196-199.
66. Donay,J.L., Mathieu,D., Fernandes,P., Pregermain,C., Bruel,P., Wargnier,A., Casin,I., Weill,F.X., Lagrange,P.H., Herrmann,J.L., 2004. Evaluation of the automated phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1542-1546.

67. Drummond,T.G., Hill,M.G., Barton,J.K., 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* 21, 1192-1199.
68. Dubois,V., Poirel,L., Arpin,C., Coulange,L., Bebear,C., Nordmann,P., Quentin,C., 2004. SHV-49, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4466-4469.
69. Dudak,F.C., Boyaci,I.H., Jurkevica,A., Hossain,M., Aquilar,Z., Halsall,H.B., Seliskar,C.J., Heineman,W.R., 2009. Determination of viable *Escherichia coli* using antibody-coated paramagnetic beads with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 949-956.
70. Eckert,C., Gautier,V., Arlet,G., 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 14-23.
71. Empel,J., Baraniak,A., Literacka,E., Mrowka,A., Fiett,J., Sadowy,E., Hryniewicz,W., Gniadkowski,M., 2008. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2449-2454.
72. Essack,S.Y., Hall,L.M.C., Livermore,D.M., 2004. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC beta-lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 398-400.
73. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual report 2007. 2008. Report.
74. Evans,B.A., Brown,S., Hamouda,A., Findlay,J., Amyes,S.G., 2007. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1137-1138.
75. Evans,B.A., Hamouda,A., Towner,K.J., Amyes,S.G., 2008. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 268-275.
76. Falagas,M.E., Bliziotis,I.A., Siempos,I.I., 2006. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care* 10, R48.
77. Fan,R., Vermesh,O., Srivastava,A., Yen,B.K., Qin,L., Ahmad,H., Kwong,G.A., Liu,C.C., Gould,J., Hood,L., Heath,J.R., 2008. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat. Biotechnol.* 26, 1373-1378.
78. Fisher,J.F., Meroueh,S.O., Mobashery,S., 2005. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* 105, 395-424.
79. Fleming,A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* 10, 226-236.
80. Ford,P.J., Avison,M.B., 2004. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 69-75.

81. Frye, J.G., Jesse, T., Long, F., Rondeau, G., Porwollik, S., McClelland, M., Jackson, C.R., Englen, M., Fedorka-Cray, P.J., 2006. DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. *Int. J Antimicrob. Agents* 27, 138-151.
82. Fukushima, M., Kakinuma, K., Hayashi, H., Nagai, H., Ito, K., Kawaguchi, R., 2003. Detection and Identification of Mycobacterium Species Isolates by DNA Microarray. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2605-2615.
83. Gaylord, B.S., Massie, M.R., Feinstein, S.C., Bazan, G.C., 2005. SNP detection using peptide nucleic acid probes and conjugated polymers: applications in neurodegenerative disease identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 102, 34-39.
84. GERMAP. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. 2008. Report.
85. Gerry, N.P., Witowski, N.E., Day, J., Hammer, R.P., Barany, G., Barany, F., 1999. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *Journal of Molecular Biology* 292, 251-262.
86. Gharizadeh, B., Akhras, M., Unemo, M., Wretling, B., Nyren, P., Pourmand, N., 2005. Detection of gyrA mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* by rapid and reliable pre-programmed short DNA sequencing. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 486-490.
87. Giske, C.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Canton, R., Walsh, T.R., 2009. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1-4.
88. Gniadkowski, M., 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 11-32.
89. Gniadkowski, M., Palucha, A., Grzesiowski, P., Hryniewicz, W., 1998. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3079-3085.
90. Goossens, H., Grabein, B., 2005. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53, 257-264.
91. Grebe, T., Hakenbeck, R., 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 829-834.
92. Grimm, V. Development of a diagnostic microarray for the rapid detection of Extended Spectrum Beta-Lactamases for the use in clinical microbiology. 2005. Institute for Technical Biochemistry, University of Stuttgart. Thesis/Dissertation.

93. Grimm,V., Ezaki,S., Susa,M., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2004. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3766-3774.
94. Guo,Z., Guilfoyle,R.A., Thiel,A.J., Wang,R.F., Smith,L.M., 1994. Direct Fluorescence Analysis of Genetic Polymorphisms by Hybridization with Oligonucleotide Arrays on Glass Supports. *Nucleic Acids Research* 22, 5456-5465.
95. Guo,Z., Liu,Q.H., Smith,L.M., 1997. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nature Biotechnology* 15, 331-335.
96. Haanpera,M., Huovinen,P., Jalava,J., 2005. Detection and quantification of macrolide resistance mutations at positions 2058 and 2059 of the 23S rRNA gene by pyrosequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 457-460.
97. Haldorsen,B., Aasnaes,B., Dahl,K.H., Hanssen,A.M., Simonsen,G.S., Walsh,T.R., Sundsfjord,A., Lundblad,E.W., 2008. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 694-702.
98. Hall,B.G., Barlow,M., 2003. Structure-based phylogenies of the serine beta-lactamases. *J. Mol. Evol.* 57, 255-260.
99. Hall,L.M., Livermore,D.M., Gur,D., Akova,M., Akalin,H.E., 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1637-1644.
100. Hall,T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
101. Hamelin,K., Bruant,G., El Shaarawi,A., Hill,S., Edge,T.A., Bekal,S., Fairbrother,J.M., Harel,J., Maynard,C., Masson,L., Brousseau,R., 2006. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4200-4206.
102. Hamels,S., Gala,J.L., Dufour,S., Vannuffel,P., Zammattéo,N., Remacle,J., 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques* 31, 1364-+.
103. Hanson,N.D., 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 2-4.
104. Hartman,B.J., Tomasz,A., 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158, 513-516.
105. Heisig,P., 2006. [Actions and resistance mechanisms of beta-lactam antibiotics: Penicillin-binding proteins, beta-lactamases and signal proteins.]. *Pharm. Unserer Zeit* 35, 400-408.
106. Henn,A. Entwicklung eines diagnostischen DNA-Microarrays zur Bestimmung von Antibiotika-Resistenzen am Beispiel der Genotypisierung von Beta-Laktamasen der Klasse D (Oxacillinasen). 2006. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart. Thesis/Dissertation.

107. Heritier,C., Poirel,L., Aubert,D., Nordmann,P., 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 268-273.
108. Heritier,C., Poirel,L., Fournier,P.E., Claverie,J.M., Raoult,D., Nordmann,P., 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4174-4179.
109. Hopkins,K.L., Deheer-Graham,A., Threlfall,E.J., Batchelor,M.J., Liebana,E., 2006. Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 572-575.
110. Howard,C., van Daal,A., Kelly,G., Schooneveldt,J., Nimmo,G., Giffard,P.M., 2002. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV beta-lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 659-664.
111. Hsia,C.C., Chizhikov,V.E., Yang,A.X., Selvapandiyan,A., Hewlett,I., Duncan,R., Puri,R.K., Nakhasi,H.L., Kaplan,G.G., 2007. Microarray multiplex assay for the simultaneous detection and discrimination of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency type-1 viruses in human blood samples. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1017-1023.
112. Huang,A., Li,J.W., Shen,Z.Q., Wang,X.W., Jin,M., 2006. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3299-3305.
113. Humeniuk,C., Arlet,G., Gautier,V., Grimont,P., Labia,R., Philippon,A., 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3045-3049.
114. Ito,T., Hosokawa,K., Maeda,M., 2007. Detection of single-base mismatch at distal end of DNA duplex by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1816-1819.
115. Jacoby,G.A., 2006. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1123-1129.
116. Jacoby,G.A., Mills,D.M., Chow,N., 2004. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3203-3206.
117. Jain,K.K., 2008. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med. Princ. Pract.* 17, 89-101.
118. Jarlier,V., Nicolas,M.H., Fournier,G., Philippon,A., 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867-878.
119. Jemima,S.A., Verghese,S., 2008. Multiplex PCR for bla(CTX-M) & bla(SHV) in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian J. Med. Res.* 128, 313-317.

120. Ji,J., Manak,M., 2002. Genotyping of single nucleotide polymorphisms for epidemiological studies: A review of current methods. *Journal of Clinical Ligand Assay* 25, 199-210.
121. Jones,C.H., Ruzin,A., Tuckman,M., Visalli,M.A., Petersen,P.J., Bradford,P.A., 2009. Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates and identification of the novel beta-lactamase genes blaSHV-48, blaSHV-105, and blaTEM-155. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 977-986.
122. Kahlmeter,G., Brown,D.F., Goldstein,F.W., MacGowan,A.P., Mouton,J.W., Osterlund,A., Rodloff,A., Steinbakk,M., Urbaskova,P., Vatopoulos,A., 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 145-148.
123. Kakinuma,K., Fukushima,M., Kawaguchi,R., 2003. Detection and identification of *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella* by microarrays using the *gyrB* gene. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 721-728.
124. Kang,C.I., Pai,H., Kim,S.H., Kim,H.B., Kim,E.C., Oh,M.D., Choe,K.W., 2004. Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1130-1133.
125. Kimura,S., Ishiguro,M., Ishii,Y., Alba,J., Yamaguchi,K., 2004. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1454-1460.
126. Knothe,H., Shah,P., Krcmery,V., Antal,M., Mitsuhashi,S., 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11, 315-317.
127. Knox,J.R., 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2593-2601.
128. Kopp,U., Wiedemann,B., Lindquist,S., Normark,S., 1993. Sequences of wild-type and mutant *ampD* genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 224-228.
129. Kresken,M., Hafner,D., Schmitz,F.-J., Wichelhaus,T.A.f.d.S. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft *Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz* der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2007. 2009. Report.
130. Kuga,A., Okamoto,R., Inoue,M., 2000. *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 561-567.
131. Lau,S.H., Kaufmann,M.E., Livermore,D.M., Woodford,N., Willshaw,G.A., Cheasty,T., Stamper,K., Reddy,S., Cheesbrough,J., Bolton,F.J., Fox,A.J., Upton,M., 2008. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all

- belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1241-1244.
132. Lee, I., Dombkowski, A.A., Athey, B.D., 2004. Guidelines for incorporating non-perfectly matched oligonucleotides into target-specific hybridization probes for a DNA microarray. *Nucleic Acids Research* 32, 681-690.
 133. Lee, S.H., Kim, J.Y., Lee, S.K., Jin, W., Kang, S.G., Lee, K.J., 2000. Discriminatory detection of extended-spectrum beta-lactamases by restriction fragment length dimorphism-polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 307-312.
 134. Lee, Y., Lee, C.S., Kim, Y.J., Chun, S., Park, S., Kim, Y.S., Han, B.D., 2002. Development of DNA chip for the simultaneous detection of various beta-lactam antibiotic-resistant genes. *Mol. Cells* 14, 192-197.
 135. Leinberger, D.M., Schumacher, U., Autenrieth, I.B., Bachmann, T.T., 2005. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4943-4953.
 136. Letowski, J., Brousseau, R., Masson, L., 2004. Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J. Microbiol. Methods* 57, 269-278.
 137. Leverstein-van Hall, M.A., Fluit, A.C., Paauw, A., Box, A.T., Brisse, S., Verhoef, J., 2002. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3703-3711.
 138. Levicky, R., Horgan, A., 2005. Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies. *Trends in Biotechnology* 23, 143-149.
 139. Lindroos, K., Sigurdsson, S., Johansson, K., Ronnblom, L., Syvanen, A.C., 2002. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res.* 30, e70.
 140. Linscott, A.J., Brown, W.J., 2005. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1081-1085.
 141. Liu, R.H., Dill, K., Fuji, H.S., McShea, A., 2006. Integrated microfluidic biochips for DNA microarray analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 253-261.
 142. Liu, R.H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J., Grodzinski, P., 2004. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal. Chem.* 76, 1824-1831.
 143. Livermore, D.M., 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
 144. Livermore, D.M., 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 3-10.
 145. Livermore, D.M., Brown, D.F., 2001. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1, 59-64.

146. Livermore,D.M., Canton,R., Gniadkowski,M., Nordmann,P., Rossolini,G.M., Arlet,G., Ayala,J., Coque,T.M., Kern-Zdanowicz,I., Luzzaro,F., Poirel,L., Woodford,N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 165-174.
147. Livermore,D.M., Yuan,M., 1996. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 38, 409-424.
148. Lopez-Otsoa,F., Gallego,L., Towner,K.J., Tysall,L., Woodford,N., Livermore,D.M., 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4741-4743.
149. Luzzaro,F., Mezzatesta,M., Mugnaioli,C., Perilli,M., Stefani,S., Amicosante,G., Rossolini,G.M., Toniolo,A., 2006. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1659-1664.
150. M'Zali,F.H., Heritage,J., Gascoyne-Binzi,D.M., Snelling,A.M., Hawkey,P.M., 1998. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum beta-lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, 123-125.
151. Mabilat,C., Courvalin,P., 1990. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2210-2216.
152. Mammeri,H., Eb,F., Berkani,A., Nordmann,P., 2008. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 498-503.
153. Mammeri,H., Poirel,L., Fortineau,N., Nordmann,P., 2006. Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2573-2576.
154. Marra,A.R., Pereira,C.A., Castelo,A., do,C.F., Jr., Cal,R.G., Sader,H.S., Wey,S.B., 2006. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 56-60.
155. Martinez-Martinez,L., 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 82-89.
156. Martinsky,T., 2003. Printing technologies and microarray manufacturing techniques: making the perfect microarray. In: E.Blalock (Ed.), *A Beginner's Guide to Microarrays*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 93-122.
157. McDowell,T.D., Reed,K.E., 1989. Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1680-1685.
158. Melzer,M., Petersen,I., 2007. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J. Infect.* 55, 254-259.

159. Meric,M., Kasap,M., Gacar,G., Budak,F., Dundar,D., Kolayli,F., Eroglu,C., Vahaboglu,H., 2008. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 214-218.
160. Meyer,K.S., Urban,C., Eagan,J.A., Berger,B.J., Rahal,J.J., 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann. Intern. Med.* 119, 353-358.
161. Mikhailovich,V., Gryadunov,D., Kolchinsky,A., Makarov,A.A., Zasedatelev,A., 2008. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases. *Bioessays* 30, 673-682.
162. Moland,E.S., Black,J.A., Ourada,J., Reisbig,M.D., Hanson,N.D., Thomson,K.S., 2002. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3837-3842.
163. Monecke,S., Ehricht,R., 2005. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 825-833.
164. Monstein,H.J., Ostholm-Balkhed,A., Nilsson,M.V., Nilsson,M., Dornbusch,K., Nilsson,L.E., 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*SHV, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 115, 1400-1408.
165. Mouritzen,P., Nielsen,A.T., Pfundheller,H.M., Choleva,Y., Kongsbak,L., Moller,S., 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA). *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 27-38.
166. Mulvey,M.R., Boyd,D.A., Baker,L., Mykytczuk,O., Reis,E.M., Asensi,M.D., Rodrigues,D.P., Ng,L.K., 2004. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (*bla*OXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(6')-I30]. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 354-359.
167. Mulvey,M.R., Bryce,E., Boyd,D.A., Ofner-Agostini,M., Land,A.M., Simor,A.E., Paton,S., 2005. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 358-365.
168. Munday,C.J., Boyd,D.A., Brenwald,N., Miller,M., Andrews,J.M., Wise,R., Mulvey,M.R., Hawkey,P.M., 2004. Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4829-4834.
169. Naas,T., Levy,M., Hirschauer,C., Marchandin,H., Nordmann,P., 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4826-4829.
170. Naas,T., Nordmann,P., 1999. OXA-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des* 5, 865-879.
171. Naas,T., Oxacelay,C., Nordmann,P., 2007. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 223-230.

172. Naas,T., Poirel,L., Nordmann,P., 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 42-52.
173. Navarro,F., Mesa,R.J., Miro,E., Gomez,L., Mirelis,B., Coll,P., 2007. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 120-123.
174. Neuwirth,C., Madec,S., Siebor,E., Pechinot,A., Duez,J.M., Pruneaux,M., Fouchereau-Peron,M., Kazmierczak,A., Labia,R., 2001. TEM-89 beta-lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3591-3594.
175. Nickerson,D.A., Tobe,V.O., Taylor,S.L., 1997. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res.* 25, 2745-2751.
176. Niederhauser,C., Kaempf,L., Heinzer,I., 2000. Use of the ligase detection reaction-polymerase chain reaction to identify point mutations in extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 19, 477-480.
177. Nordmann,P., Mammeri,H., 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future. Microbiol.* 2, 297-307.
178. Normark,S., Edlund,T., Grundstrom,T., Bergstrom,S., Wolf-Watz,H., 1977. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions. *J. Bacteriol.* 132, 912-922.
179. Novais,A., Canton,R., Moreira,R., Peixe,L., Baquero,F., Coque,T.M., 2007. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 796-799.
180. Nuesch-Inderbinen,M.T., Hächler,H., Kayser,F.H., 1996. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15, 398-402.
181. Olson,A.B., Silverman,M., Boyd,D.A., McGeer,A., Willey,B.M., Pong-Porter,V., Daneman,N., Mulvey,M.R., 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2112-2115.
182. Owczarzy,R., You,Y., Moreira,B.G., Manthey,J.A., Huang,L., Behlke,M.A., Walder,J.A., 2004. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry* 43, 3537-3554.
183. Pai,H., Kang,C.I., Byeon,J.H., Lee,K.D., Park,W.B., Kim,H.B., Kim,E.C., Oh,M.D., Choe,K.W., 2004. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3720-3728.
184. Palka-Santini,M., Cleven,B.E., Eichinger,L., Kronke,M., Krut,O., 2009. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC. Microbiol.* 9, 1.

185. Paterson,D.L., 2000. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 460-463.
186. Paterson,D.L., Bonomo,R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-686.
187. Paterson,D.L., Hujer,K.M., Hujer,A.M., Yeiser,B., Bonomo,M.D., Rice,L.B., Bonomo,R.A., 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3554-3560.
188. Paterson,D.L., Ko,W.C., Von Gottberg,A., Casellas,J.M., Mulazimoglu,L., Klugman,K.P., Bonomo,R.A., Rice,L.B., McCormack,J.G., Yu,V.L., 2001. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2206-2212.
189. Paton,R., Miles,R.S., Hood,J., Amyes,S.G., Miles,R.S., Amyes,S.G., 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2, 81-87.
190. Perez-Perez,F.J., Hanson,N.D., 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin. Microbiol.* 40, 2153-2162.
191. Perreten,V., Vorlet-Fawer,L., Slickers,P., Ehricht,R., Kuhnert,P., Frey,J., 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2291-2302.
192. Peterson,A.W., Wolf,L.K., Georgiadis,R.M., 2002. Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces. *Journal of the American Chemical Society* 124, 14601-14607.
193. Petrosino,J.F., Pendleton,A.R., Weiner,J.H., Rosenberg,S.M., 2002. Chromosomal system for studying AmpC-mediated beta-lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1535-1539.
194. Peytavi,R., Liu-Ying,T., Raymond,F.R., Boissinot,K., Bissonnette,L., Boissinot,M., Picard,F.J., Huletsky,A., Ouellette,M., Bergeron,M.G., 2005. Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *Biotechniques* 39, 89-96.
195. Philippon,A., Arlet,G., Jacoby,G.A., 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1-11.
196. Philippon,A., Labia,R., Jacoby,G., 1989. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131-1136.
197. Philippon,L.N., Naas,T., Bouthors,A.T., Barakett,V., Nordmann,P., 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2188-2195.
198. Pinho,M.G., Filipe,S.R., de Lencastre,H., Tomasz,A., 2001. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2

- (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 6525-6531.
199. Poirel,L., Gerome,P., De Champs,C., Stephanazzi,J., Naas,T., Nordmann,P., 2002a. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 566-569.
 200. Poirel,L., Girlich,D., Naas,T., Nordmann,P., 2001. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 447-453.
 201. Poirel,L., Heritier,C., Tolun,V., Nordmann,P., 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 15-22.
 202. Poirel,L., Kampfer,P., Nordmann,P., 2002b. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4038-4040.
 203. Poirel,L., Marque,S., Heritier,C., Segonds,C., Chabanon,G., Nordmann,P., 2005. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 202-208.
 204. Poole,K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20-51.
 205. Pournaras,S., Markogiannakis,A., Ikonomidis,A., Kondyli,L., Bethimouti,K., Maniatis,A.N., Legakis,N.J., Tsakris,A., 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 557-561.
 206. Prinarakis,E.E., Miriagou,V., Tzelepi,E., Gazouli,M., Tzouveleki,L.S., 1997. Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 838-840.
 207. Queenan,A.M., Foleno,B., Gownley,C., Wira,E., Bush,K., 2004. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* 42, 269-275.
 208. Randegger,C.C., Hächler,H., 2001. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1730-1736.
 209. Reinert,R.R., Low,D.E., Rossi,F., Zhang,X., Wattal,C., Dowzicky,M.J., 2007. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1018-1029.
 210. Reisbig,M.D., Hossain,A., Hanson,N.D., 2003. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of *Enterobacter* origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1141-1151.

211. Religio,A., Schwager,C., Richter,A., Ansorge,W., Valcarcel,J., 2002. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 30, e51.
212. Rice,L.B., Bellais,S., Carias,L.L., Hutton-Thomas,R., Bonomo,R.A., Caspers,P., Page,M.G., Gutmann,L., 2004. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3028-3032.
213. Richmond,M.H., Sykes,R.B., 1973. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol* 9, 31-88.
214. Robin,F., Delmas,J., Archambaud,M., Schweitzer,C., Chanal,C., Bonnet,R., 2006. CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2403-2408.
215. Robin,F., Delmas,J., Brebion,A., Dubois,D., Constantin,J.M., Bonnet,R., 2007. TEM-158 (CMT-9), a new member of the CMT-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4181-4183.
216. Robin,F., Delmas,J., Chanal,C., Sirot,D., Sirot,J., Bonnet,R., 2005. TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 beta-lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4443-4447.
217. Rodriguez,M.M., Power,P., Radice,M., Vay,C., Famiglietti,A., Galleni,M., Ayala,J.A., Gutkind,G., 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4895-4897.
218. Rodriguez-Villalobos,H., Malaviolle,V., Frankard,J., De Mendonca,R., Nonhoff,C., Deplano,A., Byl,B., Struelens,M.J., 2005. Emergence of CTX-M extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Belgium. *Euro. Surveill* 10, E050224.
219. Rolinson,G.N., 1998. Forty years of beta-lactam research. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 589-603.
220. Romero,L., Lopez,L., Rodriguez-Bano,J., Ramon,H.J., Martinez-Martinez,L., Pascual,A., 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 625-631.
221. Ronaghi,M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3-11.
222. Rose,K., Mason,J.O., Lathe,R., 2002. Hybridization parameters revisited: solutions containing SDS. *Biotechniques* 33, 54-6, 58.
223. Rossolini,G.M., D'Andrea,M.M., Mugnaioli,C., 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 33-41.
224. Ryabinin,V.A., Shundrin,L.A., Kostina,E.B., Laassri,M., Chizhikov,V., Shchelkunov,S.N., Chumakov,K., Sinyakov,A.N., 2006. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol.* 78, 1325-1340.

225. Sanders,C.C., Peyret,M., Moland,E.S., Cavalieri,S.J., Shubert,C., Thomson,K.S., Boeufgras,J.M., Sanders,W.E., 2001. Potential impact of the VITEK 2 system and the advanced expert system on the clinical laboratory of a university-based hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2379-2385.
226. Sanders,C.C., Peyret,M., Moland,E.S., Shubert,C., Thomson,K.S., Boeufgras,J.M., Sanders,W.E., 2000. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify beta-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 570-574.
227. Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
228. Sanschagrín,F., Couture,F., Levesque,R.C., 1995. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 887-893.
229. Satake,S., Yoneyama,H., Nakae,T., 1991. Role of OmpD2 and chromosomal beta-lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28, 199-207.
230. Sato,K., Hosokawa,K., Maeda,M., 2003. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8102-8103.
231. Sauer,U., Preininger,C., Hany-Schmatzberger,R., 2005. Quick and simple: quality control of microarray data. *Bioinformatics.* 21, 1572-1578.
232. Schwaber,M.J., Carmeli,Y., 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 913-920.
233. Schwaber,M.J., Navon-Venezia,S., Kaye,K.S., Ben Ami,R., Schwartz,D., Carmeli,Y., 2006. Clinical and economic impact of bacteremia with extended- spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1257-1262.
234. Sifaoui,F., Arthur,M., Rice,L., Gutmann,L., 2001. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2594-2597.
235. Sinclair,A., Arnold,C., Woodford,N., 2003. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3620-3622.
236. Singer,R.S., Finch,R., Wegener,H.C., Bywater,R., Walters,J., Lipsitch,M., 2003. Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect. Dis.* 3, 47-51.
237. Sirot,D., Recule,C., Chaibi,E.B., Bret,L., Croize,J., Chanal-Claris,C., Labia,R., Sirot,J., 1997. A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1322-1325.

238. Sirot,D., Sirot,J., Labia,R., Morand,A., Courvalin,P., Darfeuille-Michaud,A., Perroux,R., Cluzel,R., 1987a. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 323-334.
239. Sirot,J., Labia,R., Thabaut,A., 1987b. *Klebsiella pneumoniae* strains more resistant to ceftazidime than to other third-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 611-612.
240. Song,W., Moland,E.S., Hanson,N.D., Lewis,J.S., Jorgensen,J.H., Thomson,K.S., 2005. Failure of cefepime therapy in treatment of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4891-4894.
241. Southern,E., Mir,K., Shchepinov,M., 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics* 21, 5-9.
242. Steward,C.D., Wallace,D., Hubert,S.K., Lawton,R., Fridkin,S.K., Gaynes,R.P., McGowan,J.E., Tenover,F.C., 2000. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of Project ICARE laboratories. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38, 59-67.
243. Stoeva,T., Higgins,P.G., Bojkova,K., Seifert,H., 2008. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 723-727.
244. Strommenger,B., Schmidt,C., Werner,G., Roessle-Lorch,B., Bachmann,T.T., Witte,W., 2007. DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell Probes* 21, 161-170.
245. Sturenburg,E., Storm,N., Sobottka,I., Horstkotte,M.A., Scherpe,S., Aepfelbacher,M., Muller,S., 2006. Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro-generated RNA transcripts. *J. Clin. Microbiol.* 44, 909-915.
246. Szabo,D., Filetoth,Z., Szentandrassy,J., Nemedi,M., Toth,E., Jeney,C., Kispal,G., Rozgonyi,F., 1999. Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4167-4169.
247. Tang,X., Morris,S.L., Langone,J.J., Bockstahler,L.E., 2005. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J. Microbiol. Methods* 63, 318-330.
248. Tenover,F.C., Mohammed,M.J., Stelling,J., O'Brien,T., Williams,R., 2001. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: Proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's External Quality Assurance System for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 241-250.
249. Tham,T.N., Mabilat,C., Courvalin,P., Guesdon,J.L., 1990. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57, 109-115.

250. Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F., Higgins,D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
251. Thomson,C.J., Amyes,S.G., 1992. TRC-1: emergence of a clavulanic acid-resistant TEM beta-lactamase in a clinical strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 113-117.
252. Thomson,K.S., Cornish,N.E., Hong,S.G., Hemrick,K., Herdt,C., Moland,E.S., 2007. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum-beta-lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2380-2384.
253. Thomson,K.S., Moland,E.S., 2001. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3548-3554.
254. Thomson,K.S., Sanders,C.C., 1992. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1877-1882.
255. Toleman,M.A., Rolston,K., Jones,R.N., Walsh,T.R., 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2859-2863.
256. Tracz,D.M., Boyd,D.A., Hizon,R., Bryce,E., McGeer,A., Ofner-Agostini,M., Simor,A.E., Paton,S., Mulvey,M.R., 2007. ampC gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 265-271.
257. Tsakris,A., Ikonomidis,A., Spanakis,N., Pournaras,S., Bethimouti,K., 2007. Identification of a novel bla(OXA-51) variant, bla(OXA-92), from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 348-349.
258. Turton,J.F., Woodford,N., Glover,J., Yarde,S., Kaufmann,M.E., Pitt,T.L., 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2974-2976.
259. Tyagi,S., Bratu,D.P., Kramer,F.R., 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 16, 49-53.
260. Urban,C., Meyer,K.S., Mariano,N., Rahal,J.J., Flamm,R., Rasmussen,B.A., Bush,K., 1994. Identification of TEM-26 beta-lactamase responsible for a major outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 392-395.
261. Vatopoulos,A.C., Philippon,A., Tzouveleki,L.S., Komninou,Z., Legakis,N.J., 1990. Prevalence of a transferable SHV-5 type beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 26, 635-648.
262. Volokhov,D., Chizhikov,V., Chumakov,K., Rasooly,A., 2003. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4071-4080.

263. Volokhov,D., Rasooly,A., Chumakov,K., Chizhikov,V., 2002. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4720-4728.
264. Wachino,J., Kurokawa,H., Suzuki,S., Yamane,K., Shibata,N., Kimura,K., Ike,Y., Arakawa,Y., 2006. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 534-541.
265. Walsh,C., Wright,G., 2005. Introduction: antibiotic resistance. *Chem. Rev.* 105, 391-394.
266. Walther-Rasmussen,J., Hoiby,N., 2006. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 373-383.
267. Wang,R.F., Beggs,M.L., Robertson,L.H., Cerniglia,C.E., 2002a. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 175-182.
268. Wang,X., Ghosh,S., Guo,S.W., 2001. Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucleic Acids Res.* 29, E75.
269. Wang,X., Minasov,G., Shoichet,B.K., 2002b. The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J. Biol. Chem.* 277, 32149-32156.
270. Weigl,B., Domingo,G., Labarre,P., Gerlach,J., 2008. Towards non- and minimally instrumented, microfluidics-based diagnostic devices. *Lab Chip.* 8, 1999-2014.
271. Weile,J., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., Susa,M., Knabbe,C., 2007. DNA microarray for genotyping multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 325-338.
272. Weldhagen,G.F., 2004. Rapid detection and sequence-specific differentiation of extended-spectrum beta-lactamase GES-2 from *Pseudomonas aeruginosa* by use of a real-time PCR assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4059-4062.
273. Wiegand,I., Geiss,H.K., Mack,D., Sturenburg,E., Seifert,H., 2007. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1167-1174.
274. Wiegand,I., 2003. Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen. *Chemotherapie Journal* 6, 151-167.
275. Winokur,P.L., Canton,R., Casellas,J.M., Legakis,N., 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* 32 Suppl 2, S94-103.
276. Wong-Beringer,A., Hindler,J., Loeloff,M., Queenan,A.M., Lee,N., Pegues,D.A., Quinn,J.P., Bush,K., 2002. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin. Infect. Dis.* 34, 135-146.
277. Woodford,N., Ellington,M.J., Coelho,J.M., Turton,J.F., Ward,M.E., Brown,S., Amyes,S.G., Livermore,D.M., 2006a. Multiplex PCR for genes encoding

- prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 351-353.
278. Woodford,N., Fagan,E.J., Ellington,M.J., 2006b. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 154-155.
279. Yang,Q., Lishanski,A., Yang,W., Hatcher,S., Seet,H., Gregg,J.P., 2003. Allele-specific Holliday junction formation: a new mechanism of allelic discrimination for SNP scoring. *Genome Res.* 13, 1754-1764.
280. Yu,X., Susa,M., Weile,J., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2007. Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from urine samples using a genotyping DNA microarray. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 417-429.
281. Yue,H., Eastman,P., Wang,B., Minor,J., Doctolero,M., Nuttall,R., Stack,R., Becker,J., Montgomery,J., Vainer,M., Johnston,R., 2001. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Research* 29, E41-1.
282. Zhao,J.R., Bai,Y.J., Zhang,Q.H., Wang,Y., Luo,M., Yan,X.J., 2005. Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51, 135-137.
283. Zhu,L.X., Zhang,Z.W., Liang,D., Jiang,D., Wang,C., Du,N., Zhang,Q., Mitchelson,K., Cheng,J., 2007a. Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3707-3713.
284. Zhu,L.X., Zhang,Z.W., Wang,C., Yang,H.W., Jiang,D., Zhang,Q., Mitchelson,K., Cheng,J., 2007b. Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among staphylococcal clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3514-3521.
285. Zong,Z., Lu,X., Valenzuela,J.K., Partridge,S.R., Iredell,J., 2008. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 50-54.
286. Zwirgmaier,K., Ludwig,W., Schleifer,K.H., 2003. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 327-337.
287. Zwirgmaier,K., Ludwig,W., Schleifer,K.H., 2004a. Improved method for polynucleotide probe-based cell sorting, using DNA-coated microplates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 494-497.
288. Zwirgmaier,K., Ludwig,W., Schleifer,K.H., 2004b. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization--RING-FISH. *Mol. Microbiol.* 51, 89-96.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Die Bezeichnung von Aminosäuren und Nukleotiden erfolgte mit Hilfe von Ein- oder Dreibuchstabencodes gemäß der von der IUB vorgeschlagenen Nomenklatur. Alle physikalischen Größen wurden in SI-Einheiten angegeben. Weitere Abkürzungen:

A, G, C, T	Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin
ACC	Name einer β -Lactamase, <i>H. alvei</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen, <u>A</u> mbler <u>c</u> lass <u>C</u>
ACT	Name einer β -Lactamase, <u>A</u> mp <u>C</u> <u>t</u> ype
AER	<i>Aeromonas</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen
AmpC	Name einer β -Lactamase
AS	Aminosäure
BLAST	<i>basic local alignment tool</i>
bp	Basenpaare
CIT	<i>C. freundii</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMY	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen <u>C</u> eph <u>a</u> mycine
CTX-M	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen <u>C</u> efo <u>t</u> axim, isoliert in <u>M</u> ünchen
Cy	Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DHA	Name einer β -Lactamase, <i>M. morgani</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen, gefunden in <u>D</u> hahran
DK	Druckkontrolle
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDI	Edinburgh, UK
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ENT	<i>E. cloacae</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen
ESBL	<i>extended spectrum beta lactamase</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FOX	Name einer β -Lactamase, <i>A. sobria</i> -Gruppe plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen, aktiv gegen Cefo <u>x</u> itin
FRA	Frankfurt, Deutschland
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
I	Mittelwert der Nettosignalintensitäten aller Spotreplikate
IRT	inhibitorresistente β -Lactamase
Iso	klinisches Isolat
ITB	Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Deutschland
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
KI	Konfidenzintervall
KRO	Kroatien
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIR	Name einer β -Lactamase, gefunden im <u>M</u> iriam Krankenhaus

MM	Mismatch
MOS	Moskau, Russland
MOX	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen <u>Moxalactam</u>
mRI	mittlere relative Signalintensität
MUT	Mutante
MW	Mittelwert
NHK	negative Hybridisierungskontrolle
NI	Nettosignalintensität eines Spots
nt, NT	Nukleotid
ORF	<i>open reading frame</i>
OXA	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen <u>Oxacillin</u>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHK	positive Hybridisierungskontrolle
PK	Prozesskontrolle
PM	Perfect Match
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
RBK	Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RI	relative Signalintensität
RI _{MM}	relative Signalintensität des Mismatch
RI _{PM}	relative Signalintensität des Perfect Match
RKI	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHV	Name einer β -Lactamase, <u>Sul</u> fh _u dryl reagent <u>v</u> ariable
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
SSCP	<i>single strand conformational polymorphism</i>
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA
STABW	Standardabweichung
STG	Stuttgart, Deutschland
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Name einer β -Lactamase, gefunden in Patient <u>Temoneira</u>
T _M	Schmelztemperatur
TOM	Tomsk, Russland
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ΔG	Gibb'sche freie Energie
ZÜR	Zürich. Schweiz

6.2. Sondensequenzen

Die folgenden Tabellen fassen die Bezeichnungen, Sequenzen, Längen und Schmelztemperaturen aller Sondensätze, die in den aktuellsten Chip-Versionen verwendet wurden, zusammen.

6.2.1 TEM, SHV und CTX-M Dreifach-Chip

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
TEM-spezifische Sonden			
TEM 6	TTTTTTTTTTTTATGAGTATT <u>NA</u> ACATTTTCGTG	22	49.2
TEM 16	TTTTTTTTTTTTTATTCCCTT <u>NT</u> TCGGCAT	20	53.1
TEM 21	TTTTTTTTTTTTGCATTTGC <u>NT</u> TCCTGTTT	20	52.3
TEM 34	TTTTTTTTTTTTGGTGAAGTA <u>NA</u> AGATGCTGAA	22	51.2
TEM 35 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTGAAAGTAA <u>AA</u> GATGCTGAAGAT	23	50.3
TEM 35 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTGAAAGTAA <u>AA</u> CCGCTGAAGAT	23	52.5
TEM 39	TTTTTTTTTTTTCTGAAGAT <u>NA</u> GTGGGTGC	19	53.4
TEM 42	TTTTTTTTTTTTTATCAGTTGGGT <u>GN</u> ACGAGTGGGTTA	25	62.2
TEM 51	TTTTTTTTTTTTATCGAACTGGAT <u>CN</u> CAACAGCGGTAAG	27	59.8
TEM 69.1	TTTTTTTTTTTTTCGTTTTCCAAT <u>GN</u> TGAGCACTTTAA	26	54.7
TEM 69.2	TTTTTTTTTTTTTTTTCCAATGAT <u>NA</u> GCACTTTAA	24	51.6
TEM 80	TTTTTTTTTTTTTATGTGGTGC <u>GN</u> ATTATCCC	20	54.7
TEM 84	TTTTTTTTTTTTTATCCCGT <u>NT</u> TGACGCCG	19	54.7
TEM 92	TTTTTTTTTTTTTGCAACTC <u>GN</u> TCGCCGA	17	62.0
TEM 104	TTTTTTTTTTTTGACTTGGTT <u>NA</u> GTA CTACC	20	52.6
TEM 114	TTTTTTTTTTTTAAAAGCTCT <u>TC</u> NCGGATGGCA	21	50.4
TEM 115	TTTTTTTTTTTTTATCTTACCG <u>NT</u> GGCATGAC	19	52.1
TEM 124	TTTTTTTTTTTTTAGAATTATGC <u>AN</u> TGCTGCCATA	22	54.6
TEM 127	TTTTTTTTTTTTGTGCTGCC <u>NT</u> AACCATGA	18	52.7
TEM 130	TTTTTTTTTTTTTGCCATAACCATG <u>NT</u> GATAACACTG	26	57.0
TEM 145	TTTTTTTTTTTTTCGGAGG <u>AN</u> CGAAGGAGC	17	58.0
TEM 153	TTTTTTTTTTTTCCGCTTTT <u>TC</u> NCACATGGGGG	24	61.8
TEM 157	TTTTTTTTTTTTTGGGG <u>AN</u> CATGTA ACTC	18	50.9
TEM 158	TTTTTTTTTTTTATGGGGAT <u>NA</u> TGTA ACTCG	20	54.1
TEM 163	TTTTTTTTTTTTCTCGCCTT <u>GN</u> TCGTTGGGA	19	57.4
TEM 164.1	TTTTTTTTTTTTGCCTTGAT <u>NG</u> TGGGAA	17	52.4
TEM 164.2	TTTTTTTTTTTTGCCTTGATC <u>NT</u> TGGGAACC	19	56.4
TEM 165.1	TTTTTTTTTTTTTGATCGT <u>NG</u> GGAACCG	17	52.4
TEM 165.2	TTTTTTTTTTTTTGATCGT <u>GN</u> GAACCGGAG	19	57.1
TEM 173	TTTTTTTTTTTTTGAATGAAGCC <u>NT</u> ACCAAAC	20	50.7
TEM 175	TTTTTTTTTTTTCCATACCA <u>AN</u> CGACGAGC	18	53.5
TEM 179	TTTTTTTTTTTTACGAGCGT <u>GA</u> NACCATGAT	19	54.5
TEM 182	TTTTTTTTTTTTCACCACG <u>AN</u> GCCTGTAG	17	52.8
TEM 184	TTTTTTTTTTTTCGATTCTC <u>GN</u> AGCAATGGCA	20	58.7
TEM 196.1	TTTTTTTTTTTTAACTATTAAC <u>TN</u> GCGAACTACTT	23	51.8
TEM 196.2	TTTTTTTTTTTTTACTATTAAC <u>TN</u> GCGAACTACTT	22	51.3
TEM 204	TTTTTTTTTTTTCTAGCTTCC <u>CN</u> GCAACAATTA	21	55.1
TEM 218	TTTTTTTTTTTTAGTTGCAG <u>NA</u> CCACTTCT	18	53.6
TEM 221	TTTTTTTTTTTTTACCCTT <u>NT</u> TGCGCTCG	16	55.4
TEM 224	TTTTTTTTTTTTTGT <u>TC</u> GCTCGG <u>NC</u> CTTC	17	53.5
TEM 237.1	TTTTTTTTTTTTAAATCTGG <u>AN</u> CCGGTGAGC	19	57.8
TEM 237.2	TTTTTTTTTTTTTATCTGGAG <u>NC</u> GGTGAG	16	54.0
TEM 238.1	TTTTTTTTTTTTCTGGAGCC <u>NG</u> TGAGCGT	17	60.7

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
TEM 238.2	TTTTTTTTTTTTCTGAGCCG NT GAGCGTG	18	61.5
TEM 240	TTTTTTTTTTTTGAGCCGG TN AGCGTGGGT	18	63.3
TEM 244.1	TTTTTTTTTTTTGTGGGTCT NC GGGTATC	17	55.3
TEM 244.2	TTTTTTTTTTTTGTGGGTCT NC GGGTATCAT	19	56.9
TEM 262	TTTTTTTTTTTTCCGTATCGT ANT TATCTACACG	22	52.0
TEM 265	TTTTTTTTTTTTTATCTAC ANG ACGGGGA	18	52.1
TEM 268	TTTTTTTTTTTTTCGACGGGG NGT CAGGCA	17	60.1
TEM 275	TTTTTTTTTTTTTATGGATGA ACN AAATAGACAG	21	50.0
TEM 276	TTTTTTTTTTTTTGGATGA ACGAN ATAGACAGAT	21	49.8
TEM 280	TTTTTTTTTTTTTAGACAGATC GN TGAGATAGGTG	23	55.3
SHV-spezifische Sonden			
SHV 7	TTTTTTTTTTTTATGCGT TN TATTCGCCTGT	19	51.8
SHV 8	TTTTTTTTTTTTATGCGT TATN TTCGCCTGT	19	51.8
SHV 10	TTTTTTTTTTTTGTATATTCG CCN GTGTATTATCT	24	50.4
SHV 18	TTTTTTTTTTTTCTGT TAGCCN CCCTGCCG	18	58.8
SHV 19	TTTTTTTTTTTTTAGCC ACCNT GCCGC	15	58.6
SHV 25	TTTTTTTTTTTTTCGGTAC ACC AGCCC	16	59.5
SHV 35	TTTTTTTTTTTTTAGCAAAT AAACN AAGCGAAAGCC	24	54.5
SHV 43 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTGTCGG CC CGTAGG	16	61.1
SHV 43 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTGTCGG GC AGCGTAGG	16	57.8
SHV 48	TTTTTTTTTTTTGTAGGCATGAT AN AAATGGATCTGG	25	55.1
SHV 61	TTTTTTTTTTTTG CC TGG NGT GCCGAT	15	57.1
SHV 64	TTTTTTTTTTTTCGCCGAT GN ACGCTTCC	18	57.2
SHV 69	TTTTTTTTTTTTTCCCATG ATN AGCACCTT	20	54.3
SHV 80	TTTTTTTTTTTTTCGGCG CANT GCTGGC	15	61.5
SHV 89	TTTTTTTTTTTTTGCCGGT GACN AACAGCT	17	58.4
SHV 112	TTTTTTTTTTTTTCAGCG AAAAAN ACCTTGCC	19	55.2
SHV 112.SM	TTTTTTTTTTTTTCAGCG AAAAAN ATCTTGCC	20	54.0
SHV 113	TTTTTTTTTTTTTCG AAAAAC ANTTGCCGACG	20	57.3
SHV 114	TTTTTTTTTTTTTAAAC ACTT NC CG ACGG	17	56.0
SHV 114.SM	TTTTTTTTTTTTTG AAAAAC ACT TN CCGACGG	20	54.7
SHV 119	TTTTTTTTTTTTTG AT GAC GN TCGGCGAA	17	58.7
SHV 122	TTTTTTTTTTTTGT CGG CGA ANT CTGCG	16	56.7
SHV 124	TTTTTTTTTTTTTAA ACT CT GCN CCGCCG	15	59.6
SHV 126	TTTTTTTTTTTTTC CGC CG CCGN CATTACC	16	60.6
SHV 129	TTTTTTTTTTTTTCCGCC ATTAC CT NT AGCGATAACAG	25	55.0
SHV 130	TTTTTTTTTTTTTCC ATTAC CAT GN CGATAACAGC	23	56.0
SHV 134	TTTTTTTTTTTTTAA AC AG CGN CGCCAATC	17	56.1
SHV 140 _{WT}	TTTTTTTTTTTTCTGCT ACT GG CC ACCGTCGG	20	62.9
SHV 140 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTCTGCT ACT CC GG ACCGTCGG	20	62.0
SHV 142	TTTTTTTTTTTTTG CC ACC NT CGGCGG	15	63.7
SHV 145	TTTTTTTTTTTTTGCG CC NC GC AGGAT	15	62.7
SHV 146	TTTTTTTTTTTTTCGG CC CC GN AGGATTG	16	60.1
SHV 148	TTTTTTTTTTTTTCCCG C AG ANT TGACTG	16	53.1
SHV 149	TTTTTTTTTTTTTAGG ATTGN CTGCCTT	16	47.4
SHV 156	TTTTTTTTTTTTTCCAG ATCG NCGACAACG	17	56.4
SHV 158	TTTTTTTTTTTTTCGG CG ACA ANG TCACCC	17	59.6
SHV 167 _{WT}	TTTTTTTTTTTTCTGG GA ACCGAACTGAATG	20	53.7
SHV 167 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTCTGG GA AC TGACCGCTGGG	20	60.8
SHV 173	TTTTTTTTTTTTTATGAG CG NT TC CCGG	16	58.3
SHV 175 _{WT}	TTTTTTTTTTTTCT CC CG GC ACGC	14	57.2
SHV 175 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTCT CC CG GC ACGC	14	57.2

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
SHV 175 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTGCTTCCCG <u>GCGACTCC</u>	16	54.0
SHV 175 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTGCTTCCCG <u>C</u> GCGACTCC	16	54.0
SHV 179.1	TTTTTTTTTTTTTCGCCCGC <u>NACACCAC</u>	15	60.7
SHV 179.2	TTTTTTTTTTTTTGCCCGC <u>N</u> CACCACT	15	59.0
SHV 187	TTTTTTTTTTTTTCCAGCATG <u>NCCGCGAC</u>	16	60.6
SHV 192/3 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTGCGCA <u>AGCT</u> GTGTGACCA	17	59.4
SHV 192/3 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTGCGCA <u>ACG</u> GTGTGACCA	17	59.5
SHV 195	TTTTTTTTTTTTTGCTGTG <u>AN</u> CAGCCAGC	17	60.0
SHV 205	TTTTTTTTTTTTGTTCGCAAC <u>NC</u> GAGCTG	17	57.8
SHV 206	TTTTTTTTTTTTTGCAACGC <u>AN</u> CTGCTG	16	58.2
SHV 226	TTTTTTTTTTTTCCGTGTG <u>CCG</u> TCG	14	50.6
SHV 238/240 _{GEg}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>GGCGAGCG</u>	14	57.0
SHV 238/240 _{SEg}	TTTTTTTTTTTTTCGGAGCT <u>AGCGAGCGG</u>	16	58.8
SHV 238/240 _{SKg}	TTTTTTTTTTTTTCGGAGCT <u>AGCAAGCGG</u>	16	56.3
SHV 238/240 _{AEg}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>GCCGAGCG</u>	14	57.0
SHV 238/240 _{GEa}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>GGCGAACGG</u>	15	56.7
SHV 238/240 _{SEa}	TTTTTTTTTTTTTCGGAGCT <u>AGCGAA</u> CGGG	17	58.6
SHV 238/240 _{SKa}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>AGCAA</u> ACGGG	16	53.1
SHV 238/240 _{AEa}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>GCCGA</u> ACGG	15	56.7
SHV 238/240 _{AK}	TTTTTTTTTTTTTGAGAGCT <u>GCCAA</u> ACGG	15	54.0
SHV 243	TTTTTTTTTTTTCCGGGGT <u>GNGT</u> GCG	14	54.1
SHV 268	TTTTTTTTTTTTCTCGGTGAT <u>NCCC</u> CGG	16	48.2
SHV 269	TTTTTTTTTTTTGATACCC <u>NGGCGAGCAT</u>	17	57.6
SHV 278	TTTTTTTTTTTTAAATCAGCA <u>NAT</u> CGCCGGG	19	56.4
CTX-M-spezifische Sonden, Gruppen-Unterscheidung			
CTX-M 73.M1/M2	TTTTTTTTTTTTTACCAGTA <u>ANGT</u> GATGGC <u>CG</u>	19	55.0
CTX-M 73.M9	TTTTTTTTTTTTTGTACCAGTA <u>ANGT</u> TATGGC <u>CG</u>	21	53.2
CTX-M 132.M1	TTTTTTTTTTTTTGCGATAACG <u>T</u> NGCGATGAA	19	55.7
CTX-M 267.M2	TTTTTTTTTTTTTT <u>T</u> ACC <u>CA</u> AC <u>CGAGCAG</u>	17	54.6
CTX-M 267.M1	TTTTTTTTTTTTTT <u>T</u> ACC <u>CA</u> AG <u>CC</u> T <u>CAACCT</u>	17	56.1
CTX-M 267.M8	TTTTTTTTTTTTTT <u>T</u> ACC <u>CA</u> AG <u>CC</u> AG <u>AGCAG</u>	17	57.4
CTX-M 267.M9	TTTTTTTTTTTTTT <u>T</u> ACC <u>CA</u> AG <u>CC</u> GC <u>CAACAG</u>	17	55.5
CTX-M Gruppe M1-spezifische Sonden			
CTX-M 12	TTTTTTTTTTTTTTCGACAGCA <u>NCCGT</u> CACG	17	50.4
CTX-M 23	TTTTTTTTTTTTT <u>AGT</u> GC <u>CACTGNAT</u> GCACAAAC	21	-
CTX-M 27	TTTTTTTTTTTTTTCGCAAACAG <u>NGG</u> ACGTACA	19	52.9
CTX-M 35	TTTTTTTTTTTTTAAACT <u>TACCGN</u> ATTAGAGCG	20	45.7
CTX-M 38	TTTTTTTTTTTTTGAATTAGAGC <u>NGC</u> AGTCGG	19	55.8
CTX-M 77	TTTTTTTTTTTTTGATGAC <u>CCNG</u> ACCACGGT	18	-
CTX-M 89	TTTTTTTTTTTTTTCGAACCA <u>ANT</u> CTGTAAA	19	42.0
CTX-M 106	TTTTTTTTTTTTTGTAACTAT <u>ANT</u> CCGATTGC	20	46.1
CTX-M 114	TTTTTTTTTTTTTAGCACGTC <u>NAT</u> GGAAACGA	18	49.7
CTX-M 119	TTTTTTTTTTTTTCGATGTCAC <u>NGA</u> CTGAGC	18	47.3
CTX-M 140	TTTTTTTTTTTTTAAACTGATT <u>NCT</u> CACGTTGG	20	48.7
CTX-M 167.M1	TTTTTTTTTTTTTCCGTACCGAG <u>NC</u> AACGTTAA	20	52.9
CTX-M 239	TTTTTTTTTTTTTACCAGCAGC <u>NGT</u> GACTATG	19	51.5
CTX-M 240.M1	TTTTTTTTTTTTTTCAGCGGT <u>GN</u> CTATGG	16	53.1
CTX-M 278.M1	TTTTTTTTTTTTTAGCCATCGC <u>NAT</u> GTATTAG	19	47.6
CTX-M 288.M1	TTTTTTTTTTTTTAAATCGTCAC <u>NC</u> AGTTTGTA	22	47.2
CTX-M Gruppe M2-spezifische Sonden			
CTX-M 48	TTTTTTTTTTTTTTCGCGCTGCAC <u>NGA</u> TTAACACC	20	-

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
CTX-M 61.1	TTTTTTTTTTTTAATTCTCTAC <u>NGT</u> ACCGATGA	21	-
CTX-M 61.2	TTTTTTTTTTTTAATTCTCTAC <u>NTG</u> ACCGATGA	21	-
CTX-M 99	TTTTTTTTTTTTTGAATCAA <u>ANG</u> AGCGACCTG	22	49.8
CTX-M 121.M2	TTTTTTTTTTTTTACGCTGGCT <u>NAG</u> CTTGGC	18	61.6
CTX-M 159	TTTTTTTTTTTTTGGTGATGAG <u>NC</u> CTCCGTCT	20	56.3
CTX-M 230	TTTTTTTTTTTTTCATCATGGG <u>GN</u> AGTGGACGAT	20	-
CTX-M 253	TTTTTTTTTTTTTATCTAGCC <u>AGNA</u> AACCACGC	20	-
CTX-M 274.M2	TTTTTTTTTTTTTACGGAA <u>AGN</u> CGTCGAGAT	18	-
CTX-M 278.M2	TTTTTTTTTTTTTCGTGCGAGAT <u>NTT</u> CTGGCTG	20	50.2
CTX-M Gruppe M8/M25-spezifische Sonden			
CTX-M 50	TTTTTTTTTTTTTGCTGAT <u>TN</u> ACACCTCC	16	43.2
CTX-M 55	TTTTTTTTTTTTTCTGATAAC <u>NC</u> ACAGACG	17	47.6
CTX-M 222	TTTTTTTTTTTTTCCAGCA <u>TC</u> NGGCTGAGC	18	51.2
CTX-M 274.M8	TTTTTTTTTTTTTAGTCAGAN <u>AGT</u> TGTCG	16	-
CTX-M Gruppe M9-spezifische Sonden			
CTX-M 7	TTTTTTTTTTTTTCGGATGATG <u>IN</u> ACGACGG	19	-
CTX-M 21	TTTTTTTTTTTTTGCAGCACG <u>NC</u> GCTTTATG	18	52.1
CTX-M 29	TTTTTTTTTTTTTACGAGTGCG <u>ANG</u> CAGCAAAGC	22	59.6
CTX-M 52	TTTTTTTTTTTTTCATGATAC <u>NC</u> AGATAATACG	22	48.4
CTX-M 121.M9	TTTTTTTTTTTTTGCTGGCAGAN <u>CT</u> GAACGC	18	55.1
CTX-M 167.M9	TTTTTTTTTTTTTCACTGAAN <u>CT</u> ACGCTGA	19	48.5
CTX-M 183	TTTTTTTTTTTTTCACCACCAG <u>NC</u> ACGGACG	19	-
CTX-M 220.1	TTTTTTTTTTTTTGCACGCC <u>NG</u> CATTCCG	17	51.2
CTX-M 220.2	TTTTTTTTTTTTTGCAGCCAG <u>NA</u> TTCGAGCC	18	55.3
CTX-M 231	TTTTTTTTTTTTTTCGTGGACTG <u>NA</u> GGTGATAAGA	22	57.8
CTX-M 240.M9	TTTTTTTTTTTTTGCAGCAG <u>GC</u> NTACGGCAC	19	56.7
CTX-M 274.M9	TTTTTTTTTTTTTACGCAGAG <u>NGC</u> ACCCGC	17	55.4
CTX-M 288.M9	TTTTTTTTTTTTTAGAATCATC <u>ACC</u> NAAGAGCTGTAA	24	-

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: WT, Wildtyp; MUT, Mutante; SM, stille Mutation.
^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Für SNP-Positionen wurden jeweils vier Sonden entwickelt, die sich nur durch ihre zentrale Base unterscheiden (N steht repräsentativ für A, G, C und T). Relevante Mutationen sind hervorgehoben (fett) und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.
^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).
^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer berechnet. Für Sonden mit zusätzlichen künstlichen Mismatches wurde die T_M-Mismatch berechnet. Bei Sonden mit mehr als einem Mismatch konnte keine Schmelztemperatur berechnet werden. Die Sonden wurden empirisch ausgewählt.

6.2.2 AmpC-Chipmodul

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
CIT-spezifische Sonden			
AmpC 52 CIT	TTTTTTTTTTTTCCGTTGCC <u>NT</u> TATCTACCA	19	54.6
AmpC 105 CIT	TTTTTTTTTTTTTCGAAATTAAG <u>NT</u> CAGCGATCC	21	53.9
AmpC 125 CIT	TTTTTTTTTTTTTAGGGTATC <u>NG</u> CCTGCTG	17	57.3
AmpC 171 CIT	TTTTTTTTTTTTTCGACTTTAC <u>NC</u> TAACTCCAG	20	52.8
AmpC 180 CIT	TTTTTTTTTTTTTGGTTGGC <u>GN</u> CTGGC	15	59.1
AmpC 221.1 CIT	TTTTTTTTTTTTTGATTATGCC <u>NG</u> GGGCTATC	19	52.6
AmpC 221.2 CIT	TTTTTTTTTTTTTATATATGCCT <u>NG</u> GGCTATCG	19	54.5
AmpC 235.1 CIT	TTTTTTTTTTTTTCTCCGGG <u>ANA</u> ACTTGACG	18	55.7
AmpC 235.2 CIT	TTTTTTTTTTTTTCTCCGGG <u>AC</u> NACTTGACG	18	55.7
AmpC 313 CIT	TTTTTTTTTTTTTAAAGTGGCAT <u>ING</u> CAGCG	17	56.7
AmpC 321 CIT	TTTTTTTTTTTTTGGCGGTGAG <u>NT</u> AAACCCG	18	56.6
AmpC 363 CIT	TTTTTTTTTTTTTGGCAAACAAA <u>AN</u> CTATCCTAAC	22	52.0
AmpC 306 CIT	TTTTTTTTTTTTTCAACGGCA <u>AC</u> GGCAG	16	56.3
AmpC PC CIT	TTTTTTTTTTTTTGAATGAGTTACGAAGAGGCAA	21	52.6

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
ACC-spezifische Sonden			
AmpC 26 ACC	TTTTTTTTTTTTTCAAGGTGCT N IGGCTGC	17	56.9
AmpC 202/4 _{WT} ACC	TTTTTTTTTTTTTGATTGAG AAA ACCCTCCTCC	21	53.2
AmpC 202/4 _{MUT} ACC	TTTTTTTTTTTTTGATTGAG CAA ACC A TCCCTCC	21	54.0
AmpC PC ACC	TTTTTTTTTTTTTATGATTGCGGCGAAAAGTC	19	53.9
FOX-spezifische Sonden			
AmpC 43 FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTCAAG NG TATCGGAT	19	52.8
AmpC 49 FOX	TTTTTTTTTTTTTCGGGGAT NG CGGTCCG	15	59.7
AmpC 105 FOX	TTTTTTTTTTTTTGGGCTTT NG CTGGATG	17	53.6
AmpC 112 FOX	TTTTTTTTTTTTTGTAGCC AN CACGCC	15	59.2
AmpC 158 _{WT} FOX	TTTTTTTTTTTTTTACTATCGG CA CTGGTCAC	20	54.2
AmpC 158 _{MUT} FOX	TTTTTTTTTTTTTTACTATCGG AG CTGGTCAC	20	53.7
AmpC 158 _{WT} FOX	TTTTTTTTTTTTTTACTATCGG CA CTGGTCAC	19	53.8
AmpC 158 _{MUT} FOX	TTTTTTTTTTTTTTACTATCGG AG CTGGTCAC	19	53.3
AmpC 193 FOX	TTTTTTTTTTTTTGCCATTTGAG NA ACTGATGAG	21	54.4
AmpC 256 _{AC} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTT ACC GAGGC	18	53.5
AmpC 256 _{GC} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTT GCC GAGGC	18	57.2
AmpC 256 _{GT} FOX	TTTTTTTTTTTTTGTCTGAAGTTT GTC GAGGC	18	54.0
AmpC PC FOX	TTTTTTTTTTTTTCTACAGTGC GG TGGTTT	18	55.1
ENT-spezifische Sonden			
AmpC 194 ENT	TTTTTTTTTTTTTCAGGCC ATN ACGACGC	16	53.7
AmpC 219.a ENT	TTTTTTTTTTTTTCGCAT TNC GCCTGGG	15	54.4
AmpC 219.b ENT	TTTTTTTTTTTTTCGCAT TNC GCCTGGGG	16	57.4
AmpC 254.a ENT	TTTTTTTTTTTTTGGGAGCTGG NT IGATAGC	17	56.3
AmpC 254.b ENT	TTTTTTTTTTTTTGGGAGCTGG NT IGATAG	18	57.3
AmpC 264 ENT	TTTTTTTTTTTTTCTCTT CAN GTCCCTCA	19	55.2
AmpC PC ENT	TTTTTTTTTTTTTATCTGGCAACCTATACCGC	19	54.6
DHA-spezifische Sonden			
AmpC 67 DHA	TTTTTTTTTTTTTGGTTTTGCGCAT NT TCCAGG	19	51.4
AmpC 144/6 _{WT} DHA	TTTTTTTTTTTTTGGT AAAA AGCCGTGCGG	17	54.6
AmpC 144/6 _{MUT} DHA	TTTTTTTTTTTTTGGT GAAAA CCGTGCGG	17	54.9
AmpC 149 DHA	TTTTTTTTTTTTTCCGTGCG GAN CTGCT	15	55.3
AmpC PC DHA	TTTTTTTTTTTTTGGCTGTTGGTGTCTGA	18	55.5
AER-spezifische Sonden			
AmpC 85.a AER	TTTTTTTTTTTTTCCCTGTT CGAN ATAGGATCC	20	54.1
AmpC 85.b AER	TTTTTTTTTTTTTGACCCTGTT CGAN ATAGGATC	21	54.1
AmpC 124 AER	TTTTTTTTTTTTTGGGATCC GN CTTTGACAG	18	56.0
AmpC 196 _{WT} AER	TTTTTTTTTTTTTTGCCC CC TGTGATGGAG	18	55.1
AmpC 196 _{MUT} AER	TTTTTTTTTTTTTTGCCC AG TGTGATGGAG	18	52.6
AmpC 302 AER	TTTTTTTTTTTTTATCCCGT CAN CGAGCAG	17	57.4
AmpC 315 AER	TTTTTTTTTTTTTCCAAGGT GAN CCTCGAAG	18	52.4
AmpC 339 AER	TTTTTTTTTTTTTCGGCTCG AN CAATGGC	16	57.0
AmpC 366 AER	TTTTTTTTTTTTTCTACCCC ANC GAGGCG	16	55.6
AmpC PC AER	TTTTTTTTTTTTTACCTATGTCAATGTGCCGA	19	53.8

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: WT, Wildtyp; MUT, Mutante.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Für SNP-Positionen wurden jeweils vier Sonden entwickelt, die sich nur durch ihre zentrale Base unterscheiden (N steht repräsentativ für A, G, C und T). Relevante Mutationen sind hervorgehoben (fett) und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden für diejenige Sonde eines Sets berechnet, die perfekt zur jeweiligen Wildtypvariante passt. Als Wildtyp verwendete Varianten: CMY-2 (CIT), ACC-1 (ACC), FOX-1 (FOX), MIR-1 (ENT), DHA-1 (DHA) und CMY-1 (AER).

6.2.3 OXA-Chipmodul

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
OXA-spezifische Sonden, Gruppen-Unterscheidung			
OXA Gr. I	TTTTTTTTTTTTTGCCTAGAACTGGTGTGCATAA	21	52.1
OXA Gr. II - A	TTTTTTTTTTTTTTAGACGGGCTGGGAAGG	16	57.3

Sondenname ^a	Sondensequenz (5'-3') ^b	Länge ^c	T _M ^d
OXA Gr. II - B	TTTTTTTTTTTTTAAACAGGCTGGGATGGT	17	54.0
OXA Gr. II - C	TTTTTTTTTTTTTAGACCGGCTGGGAAGG	16	57.3
OXA Gr. V - 1	TTTTTTTTTTTTTAGTTTGTTCCTCAATTAGCAC	21	51.4
OXA Gr. V - 2	TTTTTTTTTTTTTAGAAGTTAATTTTGCCGATGAC	22	51.5
OXA Gr. V - 3	TTTTTTTTTTTTTACCTGCTTCGACCTTCAA	18	53.9
OXA Gruppe I-spezifische Sonden			
OXA 50 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTCAGTAAATCCTGCGCTACC	19	53.2
OXA 50 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTCAGTAAAT TAG CCTGCGCT	19	52.9
OXA 73	TTTTTTTTTTTTTAAAGATCCCCANCGCAATTAT	20	52.1
OXA 89	TTTTTTTTTTTTTAAATGAGCATCAG N TTTTCAAATG	23	52.3
OXA 124	TTTTTTTTTTTTTCAACAAATC NCC CAGAGAAGT	21	54.5
OXA 143	TTTTTTTTTTTTTCCCTATGGC ANC CAGAATATC	21	51.8
OXA 154	TTTTTTTTTTTTTGACAAATC NGG TGGAGG	20	52.7
OXA 157.1	TTTTTTTTTTTTTGGTTGGA ANC CAGCTTAG	19	55.9
OXA 157.2	TTTTTTTTTTTTTGGTTGGA GN TAGCTAAG	19	55.1
OXA 159	TTTTTTTTTTTTTAGGGTCAG CT NAGAATTTCC	20	52.0
CTX-M Gruppe II-spezifische Sonden			
OXA 23	TTTTTTTTTTTTTCATGCACAAG AN AAAAACGCA	20	52.7
OXA 149	TTTTTTTTTTTTTTGGCAAC GN CATCCTT	17	57.6
OXA 150.1	TTTTTTTTTTTTTGCAACGCC NAT CCTTCGA	18	58.2
OXA 150.2	TTTTTTTTTTTTTCAACGCC GN TCTTCGA	17	55.1
OXA 155	TTTTTTTTTTTTTTCGACAAG TN ATGGCGATT	20	52.1
OXA 159	TTTTTTTTTTTTTTCGATTACT GN ATAGAAGGCA	21	54.4
OXA 164	TTTTTTTTTTTTTAGGCAG NT TGCAATCTC	18	55.6
OXA 217	TTTTTTTTTTTTTGCCGC AT NGGTTGGTG	16	57.7
CTX-M Gruppe V, Untergruppe 1-spezifische Sonden			
OXA 95	TTTTTTTTTTTTTAGAACCAGAA ANC GGATATTAAT	23	50.0
OXA 221 _{WT}	TTTTTTTTTTTTTACTGGTTGGG CA ATGGA	17	54.3
OXA 221 _{MUT}	TTTTTTTTTTTTTGTGGG CG CAATGGA	16	56.3
CTX-M Gruppe V, Untergruppe 2-spezifische Sonden			
OXA 142	TTTTTTTTTTTTTCGGACTGGC N TAGAGCTA	18	53.5
OXA 202	TTTTTTTTTTTTTCAAGAAGAAG TN AAAAATGCTT	24	48.9
OXA 224	TTTTTTTTTTTTTATGGGGAAT GGN TGTACTC	20	54.4
OXA 257	TTTTTTTTTTTTTAAAGAAGGA ATGN CTGGTTCTAT	22	51.2
CTX-M Gruppe V, Untergruppe 3-spezifische Sonden			
OXA 24	TTTTTTTTTTTTTCTTATATAG GN CTGCTAATCCAA	24	49.9
OXA 36	TTTTTTTTTTTTTCAAAATCTGAT GN AAAAGCAG	22	49.7
OXA 38	TTTTTTTTTTTTTCTGATGAAAA AGN AGAGAAAATTAAA	26	50.9
OXA 48	TTTTTTTTTTTTTTTAAACGA AGN ACACACTACG	21	50.0
OXA 57	TTTTTTTTTTTTTTTAGTTATCC AN CAAGGTCAA	23	50.3
OXA 96	TTTTTTTTTTTTTCCACCATA AGN CAACCACCA	19	55.3
OXA 117	TTTTTTTTTTTTTAAATGGGAA AGN ACATGACC	20	52.8
OXA 136	TTTTTTTTTTTTTATCAAGAT TAN CTCGTCGTAT	22	51.4
OXA 151	TTTTTTTTTTTTTAGTGAAGCG TN TGGTTATG	20	53.1
OXA 198	TTTTTTTTTTTTTAAAGTCCA AN ATGAAGTGCA	21	51.1

^a Folgende Erweiterungen des Sondennamens wurden verwendet: WT, Wildtyp; MUT, Mutante.

^b Das 5'-Ende jeder Sonde wurde neben einem 13-Thymidinspacer mit einer C₆-Aminogruppe modifiziert. Für SNP-Positionen wurden jeweils vier Sonden entwickelt, die sich nur durch ihre zentrale Base unterscheiden (N steht repräsentativ für A, G, C und T). Relevante Mutationen sind hervorgehoben (fett) und die entsprechenden Nukleotid-Triplette unterstrichen.

^c Die angegebenen Längen beziehen sich auf den spezifischen Teil der jeweiligen Sonde (ohne Spacer).

^d Die Schmelztemperaturen wurden mit OligoAnalyzer für diejenige Sonde eines Sets berechnet, die zur jeweiligen Wildtypvariante passt. Als Wildtyp verwendete Varianten: OXA-10 (Gr. I), OXA-2 (Gr. II), OXA-23 (Gr. V Subgr. 1), OXA-24 (Gr. V Subgr. 2), OXA-51 (Gr. V Subgr. 3).

6.3. Chip-Layouts

Die folgenden 2 x 2-Subarray-Layouts wurden zum Teil während der Integration der Chipmodule und der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen verwendet und mit dem Attribut „original“ versehen, da sie (I) bereits in den Arbeiten von Verena Grimm (Grimm et al. 2004; Grimm 2005) und Maya Rubtsova beschrieben wurden und (II) die verwendeten Sonden noch keiner weiteren Optimierung bzw. einem Redesign (siehe 3.1.4.2) unterzogen wurden. Die Struktur und Farbgestaltung entsprechen der allgemeinen Layout-Darstellung in dieser Arbeit (siehe z. B. Abbildung 3-33).

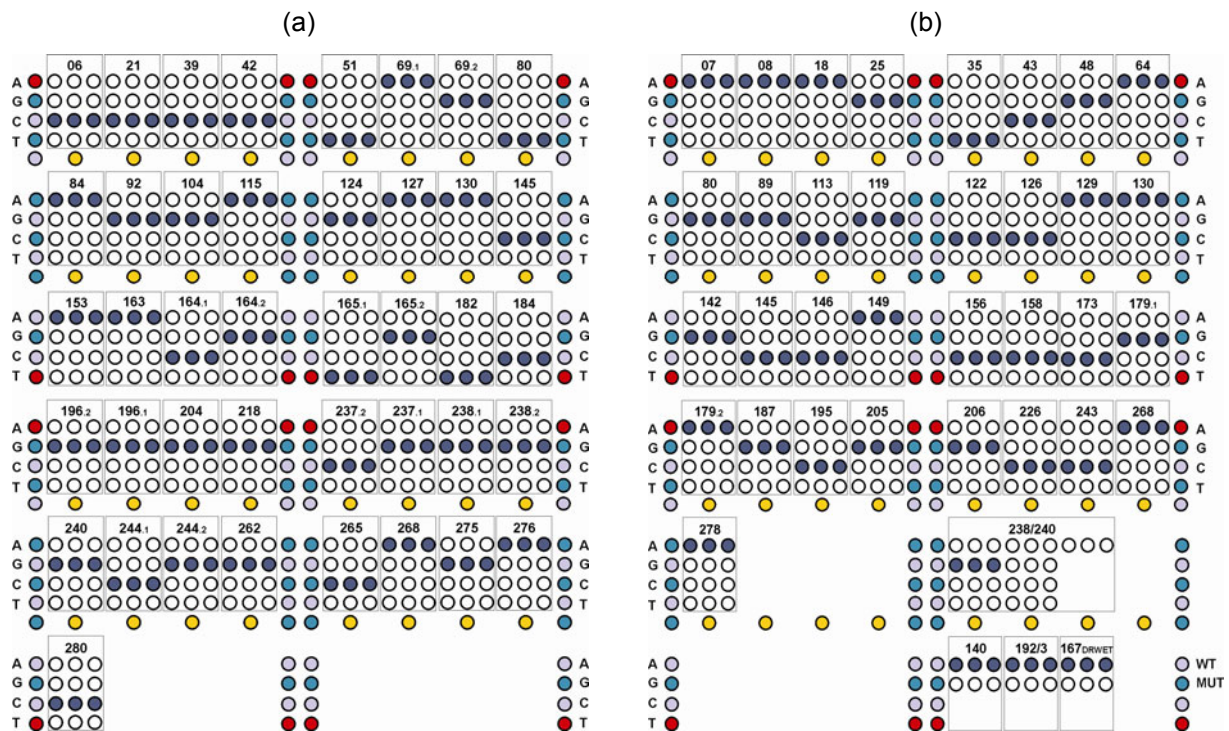


Abbildung 6-1: Original (a) TEM- und (b) SHV-Chipmodule. Die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit TEM-1 bzw. SHV-1 sind dunkelblau hervorgehoben.

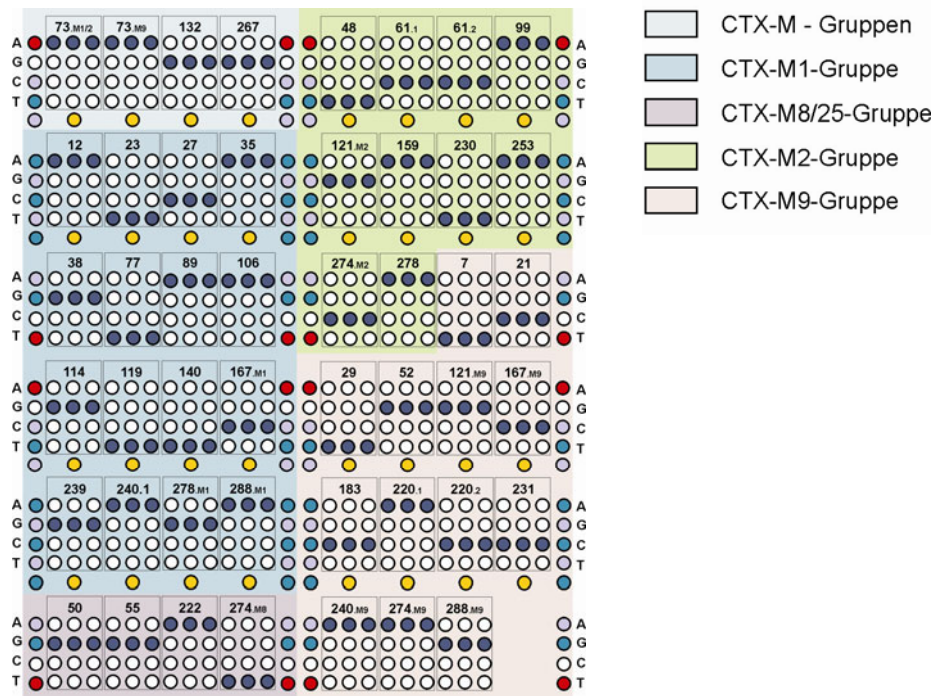


Abbildung 6-2: Original CTX-M-Chipmodul. Die theoretischen Perfect Matches bei einer Hybridisierung mit CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 und CTX-M-9 Ziel-DNA sind dunkelblau hervorgehoben.

6.4. Empfindlichkeitstestungen der klinischen Isolate

(I) Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) wurden mit Hilfe der VITEK 2-Testkarte zur Empfindlichkeitsprüfung gramnegativer Keime (AST-N062) auf einem VITEK 2XL System ermittelt. Die in Zahlen ausgedrückten Werte sind in µg/ml angegeben. R, resistent; S, empfindlich (susceptible); I, intermediär empfindlich; -, wurde nicht getestet. Die Interpretation bzw. Änderungen der MHK-Werte durch das Expert-System des VITEK wurden nicht berücksichtigt.

Nummer ^a	Isolat	ESBL ^b	PIP	AMX/MEZ	SAM/AMC	TZP	CFZ	CXM	CXM (axetil)	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MER	TET/DOX	GEN	TOB/AMK	SXT	CIP	LEV	NIT
24 ⁺	<i>E.sak.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	4 S	32 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≥16 R	4 S	≥320 R	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
55 ⁺	<i>K.oxy.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	4 S	8 S	≤1 S	≤0.25 S	≥16 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≤0.25 S	≤0.25 S	32 S
25 ⁺	<i>K.spec.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	16 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	2 S	≤1 S	≥16 R	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	128 R
2 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	16 I	≤4 S	≥64 R	16 I	16 I	≥8 R	16 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	4 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	128 R
12 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	16 I	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥8 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	0.5 S	1 S	32 S
36 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	4 S	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
1 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	16 I	16 I	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	4 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	128 R
15 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	16 I	16 I	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≤0.25 S	0.5 S	128 R
17 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	16 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≥16 R	8 I	≥320 R	1 S	1 S	64 I
52 ⁺	<i>K.oxy.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	8 I	≥16 R	≥16 S	≥320 R	1 S	2 S	128 R
5 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	16 S	≥32 R	4 S	≤4 S	≥64 R	8 S	8 I	≥8 R	≤1 S	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
19 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	16 I	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	2 S	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	128 R
49 ⁺	<i>K.spec.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
13 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	2 S	≥16 R	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
18 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≤1 S	≤1 S	≥320 S	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
20 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	2 S	2 S	≤1 S	≤20 S	≥4 S	≥8 S	≤16 S
26 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	2 S	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
33 ⁺	<i>E.coli</i>	NEG	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	32 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 S	2 R	≥16 R	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
38 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
40 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
48 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	2 S	≥16 R	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
60 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
61 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≤1 S	≤1 S	≥320 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
6 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
9 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
30 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
32 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
34 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S

Anhang

Nummer ^a	Isolat	ESBL ^b	PIP	AMX/MEZ	SAM/AMC	TZP	CFZ	CXM	CXM (axetil)	CPD	CTX/CRO	CAZ	IMP	MER	TET/DOX	GEN	TOB/AMK	SXT	CIP	LEV	NIT
57 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
3 ⁺	<i>E.int.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≤1 S	≥16 R	≤20 S	≥4 R	≥8 R	64 I
29 ⁺	<i>K.oxy.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
7 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 S	16 I	≤1 S	≤0.25 S	8 I	≥16 R	8 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
16 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
37 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≤0.25 S	≤0.25 S	32 S
10 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	2 S	≥16 R	≥16 R	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	32 S
35 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
42 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
11 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	2 I	1 S	64 I
22 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	40 S	≥4 R	≥8 R	512 R
50 ⁺	<i>K.pneu.</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
14 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≤20 S	≤0.25 S	0.5 S	32 S
28 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
21 ⁺	<i>K.ter.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
51 ⁺	<i>K.spec.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	256 R
8 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	32 I	4 S	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≤1 S	≤1 S	≥320 S	≤0.25 S	≤0.25 S	32 S
56 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	16 I	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	16 I	≤1 S	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	4 S	2 S	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
59 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	8 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
27 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	32 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
4 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≤1 S	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	8 I	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
39 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≤1 S	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	8 I	≤20 S	≥4 R	≥8 R	≤16 S
58 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	≤1 S	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	≤16 S
46 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	32 I	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	4 S	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
41 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	4 S	≤1 S	≤0.25 S	2 S	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	32 S
47 ⁺	<i>P.vul.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	64 I	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
53 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	≥128 R	≥32 R	≥32 R	16 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	≥64 R	16 I	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	64 I
31 ⁺	<i>E.coli</i>	POS	64 I	≥32 R	≥32 R	≤4 S	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≥16 R	≥16 R	≥16 R	≥320 R	≥4 R	≥8 R	≤16 S
54 ⁺	<i>C.freu.</i>	-	≥128 R	≥32 R	≥32 R	64 I	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥8 R	32 I	≥64 R	≤1 S	≤0.25 S	≤1 S	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≤0.25 S	≤0.25 S	32 S
62 ⁺	<i>K.pneu.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23 ⁺	<i>R.aqu.</i>	-	≤4 S	≥32 R	≤2 S	≤4 S	32 R	32 R	32 R	≥8 R	≤1 S	≤1 S	≤1 S	≤0.25 S	2 S	≤1 S	≤1 S	≤20 S	≤0.25 S	0.25 S	≤16 S

^a Die Isolate wurden zunächst nach Genotyp und anschließend nach Spezies sortiert. Die Proben wurden in ⁺ Frankfurt und ^{*} Stuttgart gesammelt.

^b Der VITEK ESBL-Test ist nur für *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* von der FDA anerkannt.

(II) Empfindlichkeitstestungen gemäß CLSI-Richtlinien am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland. R, resistent; S, empfindlich (susceptible); I, intermediär empfindlich; -, wurde nicht getestet.

Nummer ^a	Isolat	AMX/MEZ	AMC	PIP	TZP	CEC/CFZ	CXM	FOX	CTX	CRO	CAZ	FEP	IMP	MER	GEN/TOB	AMK	DOX	SXT	FOF	LEV/CIP/MXF	Colistin
2	<i>K.pneu.</i>	R/R	S	R	I	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	S	R	S	R/I/R	S
12	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	I	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	S	R	S	S/S/S	S
36	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	R	R/R/R	S-
1	<i>K.ter.</i>	R/R	I	R	I	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	I	R	R	I/I/R	S
15	<i>K.ter.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	R	R	S	R	S/S/S	S
17	<i>K.ter.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	S	R	S	S/S/S	S
5	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	R	S	S/S/S	S
19	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	S	S	S	S/S/S	S
13	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	R	S	S/S/S	S
18	<i>E.coli</i>	R/R	I	R	S	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	S	S	S/S/S	S
26	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/R	S	R	R	S	R/R/R	S
38	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	R	R	R	S	R/R/R	S
40	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	S	S	S/S/S	S
60	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	I	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	R	R/R/R	S
61	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	S	S	R	R/R/R	S
6	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
9	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
34	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	R	S	R/R/R	S
57	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	S/S/S	S
3	<i>E.int.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S/R	S	S	S	S	S/S/S	S
29	<i>K.oxy.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	I	R/R/R	S
7	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
16	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	R	R	R	R	R/R/R	S
37	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	R	S/S/S	S
10	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	R	R	R	R	S/S/S	-
35	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
42	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
11	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	I/I/I	S
14	<i>K.ter.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	R	S	R	S	S/S/S	S
28	<i>K.ter.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
8	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S/S	S	S	S	S	S/S/S	S
59	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
27	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	R	R/R/R	S
4	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
39	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	R	S	R/R/R	S
58	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	S/S	S	R	S	S	S/S/S	S
41	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	-	I	R	R	R/R/R	S
47	<i>P.vul.</i>	R/R	R	R	S	R/R	R	S	R	R	R	R	S	S	R/R	S	R	S	R	S/S/S	R

^a Die Isolate wurden wie oben sortiert. Die Proben wurden in gesammelt in: * Frankfurt und * Stuttgart

Anhang

(III) Empfindlichkeitstestungen gemäß CLSI-Richtlinien in der Abteilung für Labormedizin, Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland. R, resistent; S, empfindlich (susceptible); I, intermediär empfindlich; -, wurde nicht getestet.

No ^a	Isolate	AMX/MEZ	AMC	PIP	TZP/PIP-SUL	CFZ	CXM	CPD	CTX	CRO	CAZ	FEP	IMP	FOX	Aztreonam	GEN/TOB	AMK	DOX	SXT	FOF	LEV/CIP
24	<i>E.sak.</i>	R/R	R	R	S	R	R	R	I	I	I	S	S	-	-	R/R	S	I	R	-	S/S
55	<i>K.oxy.</i>	R/R	R	R	R/-	R	R	R	R	R	R	S	S	-	-	R/R	S	R	R	-	S/S
25	<i>K.spec.</i>	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-
52	<i>K.oxy.</i>	R/R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	-	R/R	I	R	R	-	R/R
49	<i>K.spec.</i>	R/-	-	R	R	R	-	-	-	R	R	-	S	-	R	R/S	-	R	R	-	R/-
20	<i>E.coli</i>	R/R	I	R	S/-	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	S/S	S	S	S	-	R/R
33	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R/-	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	R	-	R/R
48	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	S	-	R/R
30	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	S/-	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	S	-	R/R
32	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	R	R	R	-	R/R
22	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	R	-	R/R
50	<i>K.pneu.</i>	R/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	R/R	I	R	R	-	R/R
21	<i>K.ter.</i>	R/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	R	-	R/R
51	<i>K.spec.</i>	R/-	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	S	-	-	R/R	-	R	R	-	R/-
56	<i>E.coli</i>	R/-	-	R	R/-	R	-	-	-	R	R	-	S	-	R	S/S	-	R	I	-	S/-
46	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	-/R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R/R	S	R	R	-	R/R
44	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	-/R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	R	-	R/R
53	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	R/R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	R/R	S	R	R	S	R/R
31	<i>E.coli</i>	R/R	R	R	-/R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	R	R/R	R	R	R	-	R/R
54	<i>C.freu.</i>	R/-	R	R	-	R	-	-	-	R	R	-	S	-	-	S/S	-	S	S	-	S/-
62	<i>K.pneu.</i>	R/-	R	R	-	R	-	-	-	S	I	-	S	-	-	S/S	-	R	R	-	S/-
23	<i>R.aqu.</i>	R/S	S-	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	-	-	S/S	S	S-	S	-	S/S

^a Die Isolate wurden wie oben sortiert. Die Proben wurden in gesammelt in: ⁺ Frankfurt und ⁺ Stuttgart

Antibiotika-Abkürzungen: Amikacin (AMK), Amoxicillin-Clavulansäure (AMC), Ampicillin (AMX), Ampicillin-Sulbactam (SAM), Cefaclor (CEC), Cefazolin (CFZ), Cefepime (FEP), Cefoxitin (FOX), Cefotaxim (CTX), Cefpodoxim (CPD), Ceftazidim (CAZ), Ceftriaxon (CRO), Cefuroxim (CXM), Ciprofloxacin (CIP), Doxycyclin (DOX), Fosfomycin (FOF), Gentamicin (GEN), Imipenem (IMP), Levofloxacin (LEV), Meropenem (MER), Mezlocillin (MEZ), Moxifloxacin (MXF), Nitrofurantion (NIT), Piperacillin (PIP), Piperacillin-Sulbactam (PIP-SUL), Piperacillin-Tazobactam (TZP), Tetracyclin (TET), Tobramycin (TOB), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT).

6.5. Sequenzen der detektierten *bla*-Gene

Nr. ^a	Isolat	GenBank Accession-Nr.		
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}
24 [†]	<i>E. sakazakii</i>	FJ668730	FJ668807	-
55 [†]	<i>K. oxytoca</i>	FJ668748	FJ668817	-
25 [†]	<i>Klebsiella spec.</i>	-	FJ668808	-
2 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668715	FJ668797	-
12 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668720	FJ668801	-
36 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668735	FJ668812	-
1 ⁺	<i>K. terrigena</i>	FJ668714	FJ668796	-
15 ⁺	<i>K. terrigena</i>	FJ668723	FJ668803	-
17 ⁺	<i>K. terrigena</i>	FJ668725	FJ668805	-
52 [†]	<i>Klebsiella spec.</i>	FJ668746	FJ668816	-
5 ⁺	<i>E. coli</i>	-	FJ668798	-
19 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	-	FJ668806	-
49 [†]	<i>Klebsiella spec.</i>	FJ668743	FJ668815	FJ668779
13 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668721	-	FJ668758
18 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668726	-	FJ668761
20 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668727	-	FJ668762
26 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668731	-	FJ668765
33 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668734	-	FJ668771
38 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668737	-	FJ668775
40 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668739	-	FJ668776
48 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668742	-	FJ668778
60 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668750	-	FJ668784
61 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668751	-	FJ668785
6 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668753
9 ⁺	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668755
30 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668769
32 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668770
34 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668772
57 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668782
3 ⁺	<i>E. intermedium</i>	-	-	FJ668752
29 [†]	<i>K. oxytoca</i>	-	FJ668810	FJ668768
7 ⁺	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668717	FJ668799	FJ668754
16 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668724	FJ668804	FJ668760
37 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668736	FJ668813	FJ668774
10 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	-	FJ668800	FJ668756
35 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	-	FJ668811	FJ668773
42 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	-	FJ668814	FJ668777
11 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668719	-	FJ668757
22 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668729	-	FJ668764
50 [†]	<i>K. pneumoniae</i>	FJ668744	-	FJ668780
14 [†]	<i>K. terrigena</i>	FJ668722	FJ668802	FJ668759
28 [†]	<i>K. terrigena</i>	-	FJ668809	FJ668767
21 [†]	<i>K. terrigena</i>	FJ668728	-	FJ668763
51 [*]	<i>Klebsiella spec.</i>	FJ668745	-	FJ668781
8 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668718	-	FJ668786
56 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668787
59 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668749	-	FJ668783 + FJ668792
27 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668732	-	FJ668766 + FJ668791
4 ⁺	<i>E. coli</i>	FJ668716	-	FJ668788
39 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668738	-	FJ668789
58 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668790
46 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668741	-	FJ668794
41 [†]	<i>E. coli</i>	-	-	FJ668793
47 [†]	<i>P. vulgaris</i>	-	-	FJ668795
44 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668740	-	-
53 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668747	-	-
31 [†]	<i>E. coli</i>	FJ668733	-	-
54 [†]	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
62 [†]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	FJ668818	-
23 [†]	<i>Rahnella aquatilis</i>	-	-	-

^a Die Isolate wurden zunächst nach Genotyp und anschließend nach Spezies sortiert. Isolat-Nummern wurden nur als Bezeichnung und zur Verblindung der DNA-Proben verwendet. Die Proben wurden in [†] Frankfurt und ⁺ Stuttgart gesammelt.

6.6. Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

6.6.1 Publikationen

Dirk M. Leinberger, Verena Grimm, Maya Rubtsova, Jan Weile, Klaus Schröppel, Thomas A. Wichelhaus, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. Integrated Detection of Extended Spectrum Beta-Lactam Resistance by DNA Microarray-Based Genotyping of TEM, SHV and CTX-M genes. *Journal of Clinical Microbiology*, eingereicht.

Dirk M. Leinberger, Verena Grimm, Ulrike Schumacher, Ingo Autenrieth, Cornelius Knabbe, Till T. Bachmann. Diagnostische DNA-Microarrays – eine schnelle Option für die klinische Mikrobiologie. *BIOspektrum*, 2/06, 12. Jahrgang.

6.6.2 Konferenzbeiträge:

Vortrag: Dirk M. Leinberger, Verena Grimm, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. Rapid genotyping of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) using DNA Microarrays. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 30. September - 03. Oktober 2007, Göttingen, Deutschland.

Poster: Dirk M. Leinberger, Timo Barl, Verena Grimm, Xiaolei Yu, Anja Henn, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Ulrich Dobrindt, Jörg Hacker, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. Towards multiparametric diagnostics of infectious diseases using DNA microarrays in the clinic. 3rd annual Advances in Microarray Technology (AMT) conference. 15. - 16. Mai 2007, Edinburgh, UK.

Poster: Dirk M. Leinberger, Verena Grimm, A. Henn, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. Comprehensive detection of beta-lactam resistance in clinical microbiology by DNA chip based genotyping. 8. Statusseminar Chiptechnologien, 02. - 03. Februar 2006, Frankfurt am Main, Deutschland.

Poster: Dirk M. Leinberger, Verena Grimm, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. Rapid genotyping of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) using DNA Microarrays. 2. gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 25. -28. September 2005, Göttingen, Deutschland.

Poster: Verena Grimm, Dirk M. Leinberger, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. DNA microarray genotyping based detection of TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases. *BioPerspectives*, 10. - 11. Mai 2005, Wiesbaden, Deutschland.

Poster: Verena Grimm, Dirk M. Leinberger, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. DNA microarray genotyping based detection of beta-lactamases for clinical microbiology. 7. Statusseminar Chiptechnologien, 03. - 04. Februar 2005, Frankfurt am Main, Deutschland.

Poster: Verena Grimm, Dirk M. Leinberger, Maya Rubtsova, Milorad Susa, Cornelius Knabbe, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann. DNA microarray genotyping based detection of beta-lactamases for clinical microbiology. 19. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., 23. - 25. September 2004, Bonn, Deutschland.

6.7. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid für das Vertrauen beim Überlassen des sehr interessanten Themas und für die Möglichkeit, am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart promovieren zu dürfen, bedanken. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut, die exzellente technische Ausstattung, sein Interesse an meiner Arbeit und seine Anregungen legten den Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Till T. Bachmann für die Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit und diverser Publikationen, die Korrektur der Arbeit und der Gelegenheit, einen Teil meiner Arbeit an der Division of Pathway Medicine in Edinburgh durchzuführen. Seine engagierte Leitung der Arbeitsgruppen in Stuttgart und Edinburgh war für mich stets eine große Motivation.

Dr. Verena Grimm möchte ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema danken. Die gute Zusammenarbeit und die Diskussionen zu Beginn dieser Arbeit sowie der Informationsaustausch hinsichtlich ihrer Vorarbeiten am TEM- und SHV-Microarray haben mir sehr geholfen.

Des Weiteren danke ich Anja Henn für die hervorragende Arbeit am OXA-Microarray. Dieser Chip entstand im Rahmen einer Diplomarbeit und bildete die Basis einiger Experimente dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei ihr und Jan Haas für die Unterstützung im Labor bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern am Institut für Technische Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Kristina, Timo, Harald, Beate, Holger, Marco, Xiaolei und Susie, einigen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Gruppe Analytische Biotechnologie am ITB, für die nicht selbstverständliche Hilfsbereitschaft, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und den freundlichen Umgang bedanken. Weiterhin bin ich Harald für die Fotografie des Dreifach-Chips und Karin für die Unterstützung bei der Sequenzierung einiger Referenzstämme und klinischer Isolate sehr dankbar.

Prof. Peter Ghazal danke ich für die Einladung an die Division of Pathway Medicine in Edinburgh. Ebenso möchte ich Julie, Alan und Petter für die Unterstützung im neuen Labor danken. Dem DAAD bin ich für die finanzielle Unterstützung während meines Aufenthalts in Edinburgh dankbar.

Die meisten Inhalte dieser Arbeit wurden im Rahmen des GenoMik-Projekts (Genomforschung an Mikroorganismen) bearbeitet. Für die Finanzierung dieses Projekts danke ich dem BMBF. Mein weiterer Dank gilt den Projektpartnern:

Prof. Dr. Cornelius Knabbe, PD Dr. Klaus Schröppel, Dr. Milorad Susa und Dr. Jan Weile vom Robert Bosch Krankenhaus in Stuttgart danke ich für die Bereitstellung von klinischen Isolaten, der Durchführung phänotypischer Empfindlichkeitstestungen, der Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen, der Anzucht klinischer Isolate und Bereitstellung extrahierter DNA. Auch der Gedankenaustausch hinsichtlich der klinischen Routine war sehr hilfreich.

Ich möchte auch Prof. Dr. Wolfgang Witte, Dr. Birgit Strommenger, Dr. Yvonne Pfeiffer und den Mitarbeitern des Robert Koch Instituts in Wernigerode für ihre inspirierenden und auch kritischen Anregungen während der Projekttreffen danken. Des Weiteren bedanke ich mich für die Bereitstellung der Isolate zur Testung des AmpC-Chips.

Bei Dr. Wolfgang Ludwig, Dr. Katrin Fichtl und Dr. Natalie Ludyga vom Mikrobiologischen Institut der Technischen Universität München möchte ich mich für die freundliche Aufnahme

und Unterstützung bei meinem Aufenthalt in München und den wissenschaftlichen Austausch in den Bereichen ARB und Speziesidentifikation bedanken.

Insbesondere bin ich Maya Rubtsova von der Chemischen Fakultät der M. V. Lomonosov Moscow State University in Moskau, Russland, dankbar für die Entwicklungen im Bereich des CTX-M-Microarrays, Anregungen, konstruktive Hinweise und die tolle wissenschaftliche Kommunikation.

Mein weiterer Dank gilt der Firma Eppendorf AG, die als Industriepartner diese Arbeit mit der Bereitstellung von Materialien und technischem Gerät unterstützt hat. Für den interessanten Austausch hinsichtlich des diagnostischen Marktes bin ich ebenfalls dankbar.

Mein großer Dank gilt auch zwei weiteren Projektpartnern, die mit der Bereitstellung von klinischen Isolaten die Validierung der entwickelten Microarrays ermöglichten. PD Dr. med. Thomas A. Wichelhaus vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main danke ich für die Bereitstellung klinischer Isolate zur Validierung des ESBL Chips, die Übermittlung zugehöriger Empfindlichkeitsdaten und wichtige Anregungen aus der dem Bereich der klinischen Mikrobiologie. Außerdem möchte ich Prof. Sebastian Amyes und Dr. Ahmed Hamouda der Arbeitsgruppe Molekulare Chemotherapie des Zentrums für Infektionskrankheiten in Edinburgh, UK, für die Auswahl und Bereitstellung von Isolaten zur Validierung des OXA-Chips danken.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank meiner Frau Simone, die mir in allen Lebenslagen zur Seite steht, meinen Eltern Katharina und Helmut Leinberger, meiner Schwester Christina und ihrer Familie sowie Simones Familie. Ihnen und allen Freunden möchte ich für die unglaubliche Hilfe und Unterstützung danken, die mir in den letzten Jahren zuteil wurde und stets großen Rückhalt gab.

6.8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Leinberger
 Vorname: Dirk Michael
 Geburtsdatum: 16. April 1977
 Geburtsort: Tettang
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung und Zivildienst

1996/1997 **Zivildienst** in der Stiftung Liebenau in Meckenbeuren
 1987-1996 **Abitur** am Montfort-Gymnasium in Tettang
 1983-1987 **Grundschule** in Kau

Studium und Forschung

4/2007-9/2007 **Forschungsaufenthalt in Schottland**
 Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für einen Forschungsaufenthalt an der University of Edinburgh Medical School, Division of Pathway Medicine (*Prof. Peter Ghazal*), Bacterial Chips Group (*PD Dr. Till T. Bachmann*).

11/2004-8/2009 **Promotion**
 Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart (*Prof. Rolf D. Schmid*), Arbeitsgruppe Analytische Biotechnologie/Biosensoren (*PD Dr. Till T. Bachmann*).
 „Diagnostische DNA-Microarrays zum Nachweis von β -Lactam Resistenzen in der klinischen Mikrobiologie mittels Genotypisierung bakterieller Resistenzgene.“

10/2003-10/2004 **Diplomarbeit**
 Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart (*Prof. Rolf D. Schmid*), Arbeitsgruppe Analytische Biotechnologie/Biosensoren (*PD Dr. Till T. Bachmann*).
 „Entwicklung eines DNS-Microarrays zur Detektion und Identifikation humanpathogener Pilze.“

11/2000-04/2001 **Studienarbeit**
 Biologisches Institut der Universität Stuttgart, Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen (*Prof. Dr. Holger Jeske*) und Max-Planck-Institut für Festkörperforschung, Nanoscale Science Department, Stuttgart (*PD Dr. Alexander Bittner*).
 „Produktion von Potato virus X in Versuchspflanzen sowie Adsorption und Micro-Contact Printing von Virus-Partikeln“.

10/1997-10/2003 **Studium der Technischen Biologie** an der Universität Stuttgart.
 Diplomprüfungen in Technischer Biochemie, Biotransformation, Bioverfahrenstechnik, Genetik und Biochemie.