

**Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Detektion  
von Resistenzdeterminanten in *Acinetobacter  
baumannii***

**Development of a DNA-Microarray for genotyping antibiotic  
resistance determinants in *Acinetobacter baumannii***

**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

Diplom Biologe (t.o.)

Simon Dally

geb. am 16.04.1983 in Stuttgart

Gutachter: 1. PD Dr. S. Rupp  
2. Prof. Dr. C. Knabbe  
3. Prof. Dr. P. Scheurich

Datum der mündlichen Prüfung: 29.04.2014

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie

der Universität Stuttgart

2014



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

Stuttgart, Juni 2014

Simon Dally

## Abkürzungsverzeichnis

AME	Aminoglykosid-modifizierende Enzyme
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA ( <i>double-stranded DNA</i> )
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single-stranded DNA</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
MHK	Minimale Hemmkonzentration
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RU	<i>response units</i>
UKS	Umkehr der Konformations-Selektivität

## Abkürzungen für Nukleotide gemäß IUPAC Nomenklatur

A	Adenin	R	A oder G	W	T oder A
C	Cytosin	Y	C oder T	S	C oder G
G	Guanin	M	C oder A	N	A, T, C oder G
T	Thymin	K	T oder G		

## Zusammenfassung

*Acinetobacter baumannii* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, welches schwere Infektionen, insbesondere Pneumonie, Sepsis, Harnwegs- oder Wundinfekte, auslösen kann. Es besitzt die Fähigkeit, in beachtlichem Ausmaß, Antibiotika-Resistenzen zu akquirieren, was die Behandlung infizierter Patienten erheblich erschwert. Erst nach der Detektion dieser Resistenzen lässt sich eine gezielte antibiotische Therapie initiieren.

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Microarray entwickelt, der die Diagnose von Resistenzdeterminanten in *A. baumannii* ermöglicht. Der Zeitbedarf für die Arrayanalyse lag mit 4 Stunden dabei deutlich unter dem für konventionelle kulturbasierte Methoden. Der neu entworfene Microarray ist mit seinen 370 speziell entwickelten Sonden dazu in der Lage, 91 Zielsequenzen, die mit einer Antibiotika-Resistenz assoziiert sind, nachzuweisen. Die Etablierung dreier Multiplex-PCRs, die der simultanen Amplifikation dieser Sequenzen dienen, war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Der Array wurde mit 60 multiresistenten *A. baumannii* Stämmen in einer prospektiven, verblindeten Studie validiert. In diesem Kollektiv konnten 195 Gene für  $\beta$ -Laktamasen, 201 für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme, 101 mobile genetische Elemente, 114 relevante Punktmutationen und 377 andere resistenzvermittelnde Gene detektiert werden. Die Resultate der Microarrayanalysen wurden mit dem jeweiligen Phänotyp der Isolate verglichen. Zur Bestimmung des Phänotyps kam der VITEK2, ein automatisiertes System zur Antibiotika-Sensitivitätstestung, zum Einsatz. Der VITEK2 testete die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber den Antibiotika Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin, Tobramycin, Ciprofloxacin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Tigecyclin. Die durchschnittliche Sensitivität und Spezifität des Microarrays hinsichtlich der Prognose eines Phänotyps lagen beide bei 98%. Der positive und negative Vorhersagewert der Arrayanalyse betrug 99% bzw. 94%. Die Ergebnisse der Microarray-basierten Detektion von Genen für Carbapenemasen wurden zusätzlich mit den Resultaten von Singleplex-PCR-basierten Screenings verglichen. Diese stimmten vollständig miteinander überein. Es konnte gezeigt werden, dass der Microarray dazu in der Lage ist, alle relevanten Resistenzdeterminanten parallel zu detektieren. Die kurze Bearbeitungszeit, die für eine Analyse veranschlagt werden muss, gewährt die schnelle Verfügbarkeit therapierelevanter Resultate. Damit ist eine schnelle Anpassung der Medikation

kritisch erkrankter Patienten und konsekutiv eine Verbesserung ihrer Prognose möglich. Auch zur Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen könnte der Microarray eingesetzt werden.

Im Zuge der Entwicklungsarbeit traten in einzelnen Hybridisierungsexperimenten Effekte auf, die sich durch derzeit existierende Modelle für den Hybridisierungsmechanismus nicht erklären ließen. Diese Effekte wurden zunächst in weiteren Versuchsreihen charakterisiert, um deren Ursache zu bestimmen. Auf Basis der hierbei generierten Daten konnte ein neues Modell für den Hybridisierungsmechanismus entwickelt werden. Dieses ist dazu in der Lage, eine Erklärung für sämtliche Effekte mit bislang unbekannter Ursache zu liefern. Das Modell basiert auf der Hypothese, dass doppelsträngiges PCR-Produkt nur dann an seine spezifische Sonde binden kann, wenn in der Reaktion auch einzelsträngige DNA vorliegt, die die Hybridisierung katalysiert. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass einzelsträngige DNA das Hybridisierungsverhalten von doppelsträngiger DNA massiv beeinflusst. Die dabei generierten Daten indizieren, dass dies gemäß dem neu entwickelten Modell für den Hybridisierungsmechanismus geschieht. Das Modell könnte nicht nur zum tieferen Verständnis der Hybridisierungsreaktion beitragen, sondern hat auch unmittelbaren praktischen Nutzen bei der Interpretation von Sondensignalen bestehender Arrays oder der Entwicklung neuer Microarrays. So ließen sich beispielsweise aus dem Modell Richtlinien zur Optimierung bestehender Sonden ableiten, die bereits beim Re-Design einzelner Sonden des entwickelten Microarrays erfolgreich angewandt wurden.

## **Abstract**

*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic human pathogen, which typically causes urinary tract or wound infections, pneumonia, and sepsis. It has the ability to acquire resistances against antibiotics remarkably fast. This makes the adequate treatment of infected patients difficult. A targeted antibiotic treatment can be initiated not before the detection of these resistances.

In this work a DNA-Microarray was developed, which allows the detection of resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. The time to result of the array based analysis was much shorter than for culture based methods. The newly developed microarray consists of 370 specific probes and it is capable of detecting 91 targets associated with antibiotic resistance. The establishment of three multiplex-PCRs for the simultaneous amplification of the target sequences was also part of this work. The array was validated with 60 multi-drug-resistant strains of *A. baumannii* in a blinded prospective study. In this collection 195  $\beta$ -lactamases, 201 aminoglycoside modifying enzymes, 101 mobile elements, 114 relevant point mutations and 377 other resistance conferring genes were detected. The results of the microarray analyses were compared to the corresponding phenotype of each isolate. The resistance phenotype was determined by the automated system VITEK2. Considered antibiotics were Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin, Tobramycin, Ciprofloxacin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, and Tigecyclin. The average sensitivity and specificity of the array based prediction for a phenotype were 98% each. The positive and negative predictive values were 99% and 94%, respectively. The presence of genes coding for carbapenemases, which were detected by the array, was confirmed by singleplex-PCR based screenings of all strains. It turned out that the developed microarray was capable of detecting all relevant resistance determinants simultaneously. The short lead time of one analysis provides therapy relevant results within four hours. This enables the fast adaption of the antiinfective therapy of critically ill patients. The array might also be suitable for the examination of epidemiologic issues.

In the course of the array development several hybridization results showed an unexpected pattern, which could not be explained with current literature. In order to elucidate the cause of these patterns, several hybridization experiments were conducted. The generated data enabled the development of a novel model for the

## Abstract

hybridization mechanism. This model is capable of giving an explanation for the yet inexplicable effects. The model is based on the hypothesis that a double-stranded PCR-product is unable to hybridize to microarray probes without single-stranded DNA as catalyst. The experiments conducted showed that single-stranded DNA massively influences the hybridization behavior of double-stranded DNA. The newly developed model may deepen our understanding of hybridization reactions and has immediate practical value for microarray applications. It may enable a more accurate interpretation of probe signals of existing arrays and simplify the development of new microarrays. For example, guidelines for the optimization of probes could be derived from the model, which were successfully applied for the redesign of some probes of the developed microarray.

## **Inhalt**

1.	Einleitung .....	1
1.1	Infektionskrankheiten .....	1
1.2	Antibiotika .....	1
1.3	Bakterielle Resistenzen .....	2
1.4	<i>Acinetobacter</i> spp. ....	3
1.5	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	5
1.5.1	Klinische Relevanz .....	5
1.5.2	Epidemiologie .....	6
1.5.3	Vektoren .....	6
1.5.4	Pathogenität .....	7
1.5.5	Diagnostik .....	7
1.5.6	Therapie .....	7
1.5.7	Relevante Antibiotika und Resistenzen .....	8
1.6	Genotypische Resistenzdetektion .....	15
1.7	DNA-Microarray-Technologie .....	16
2.	Zielsetzung dieser Arbeit .....	17
3.	Material und Methoden .....	18
3.1	Material .....	18
3.1.1	Chemikalien und Enzyme .....	18
3.1.2	Kits .....	19
3.1.3	Lösungen und Medien .....	19
3.1.4	Geräte .....	21
3.1.5	Software .....	22
3.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	22
3.1.7	Bakterielle Stämme und Isolate .....	23
3.1.8	DNA-Proben .....	24
3.2	Methoden .....	24

## Inhalt

3.2.1	Speziesidentifikation .....	24
3.2.2	Anlegen von Kryokulturen .....	24
3.2.3	Antibiotika Sensitivitätstestung .....	25
3.2.4	DNA-Extraktion.....	25
3.2.5	Polymerasekettenreaktion.....	25
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	28
3.2.7	Lab-on-a-chip Elektrophorese.....	29
3.2.8	Quantifizierung von DNA.....	29
3.2.9	Erzeugung kompetenter Zellen.....	31
3.2.10	Transformation kompetenter Zellen.....	31
3.2.11	Sequenzierung .....	32
3.2.12	Auswahl von Zielgenen.....	33
3.2.13	Datenbankaufbau .....	33
3.2.14	Primerdesign.....	34
3.2.15	Sondendesign.....	34
3.2.16	Herstellung von Microarrays.....	35
3.2.17	Hybridisierung .....	36
3.2.18	Microarray Signaldetektion .....	37
3.2.19	Dateninterpretation.....	37
3.2.20	Statistische Auswertung .....	38
3.2.21	Oberflächenplasmonenresonanzspektrometrie .....	38
4.	Ergebnisse .....	40
4.1	Identifikation Resistenz-relevanter Targets .....	40
4.2	Datenbankaufbau .....	41
4.3	Detektionsstrategien .....	42
4.4	Primerdesign.....	44
4.5	Primertestung mit Positivkontrollen.....	44
4.6	Sondendesign.....	45
4.7	Microarrayherstellung.....	45

## Inhalt

4.8	Sondenvalidierung.....	47
4.9	Multiplex-PCR-Etablierung.....	47
4.9.1	Test einer 168-plex-PCR.....	48
4.9.2	Einteilung von Primerpools.....	50
4.10	Test der Arrayanalyse mit einem Referenzstamm.....	55
4.11	Test der Arrayanalyse an klinischen Isolaten.....	56
4.12	Analyse anderer <i>Acinetobacter</i> -Spezies.....	58
4.13	Array-Validierung mittels klinischer <i>A. baumannii</i> Isolate.....	59
4.14	Qualitative Bewertung der Sondensignale.....	61
4.15	Zeitbedarf der Arrayanalyse.....	63
4.16	Einzelanalyse jedes Isolats.....	64
4.17	Korrelation des Genotyps und Phänotyps.....	67
4.17.1	Piperacillin/Tazobactam.....	68
4.17.2	Ceftazidim.....	68
4.17.3	Imipenem & Meropenem.....	69
4.17.4	Sulfamethoxazol/Trimethoprim.....	70
4.17.5	Aminoglykoside.....	71
4.17.6	Ciprofloxacin.....	72
4.17.7	Tigecyclin.....	72
4.18	Sensitivität und Spezifität des Arrays.....	73
4.19	Untersuchung des Hybridisierungsmechanismus.....	74
4.19.1	Konformations-Selektivität der PCR-Produkte.....	74
4.19.2	Umkehr der Konformations-Selektivität eines PCR-Produkts.....	76
4.19.3	Hybridisierungsverhalten der Produkte einer asymmetrischen PCR.....	80
4.19.4	Test des Einflusses von ssDNA auf Hybridisierungen.....	82
4.19.5	Messung der Hybridisierungseffizienz von ssDNA und PCR-Produkt.....	83
5.	Diskussion.....	86
5.1	Bewertung der Sondensignale.....	86
5.2	Bewertung der verschiedenen Detektionsstrategien.....	87

## Inhalt

5.3	Interpretation der statistischen Daten .....	88
5.4	Epidemiologie.....	89
5.5	Microarraytechnologie in der Diagnostik .....	90
5.6	Vergleich mit bestehenden Microarray-Systemen.....	91
5.7	Theorie zum Hybridisierungsmechanismus .....	92
5.7.1	Entwicklung eines neuen Hybridisierungsmodells.....	93
5.7.2	Aspekte des entwickelten Modells in gegenwärtiger Literatur.....	97
5.7.3	Anwendungen des entwickelten Modells .....	98
5.8	Ausblick .....	99
6.	Publikationen .....	100
7.	Danksagung.....	101
8.	Literaturverzeichnis .....	103
9.	Anhang.....	113
10.	Curriculum Vitae.....	121



## 1. Einleitung

*Acinetobacter baumannii* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, das dazu in der Lage ist schwere Infektionskrankheiten auszulösen. Die antibiotische Therapie dieser Infektionen gestaltet sich aufgrund der vielfältigen Resistenzmechanismen des Keims häufig problematisch. Der Diagnostik dieser Resistenzen muss daher bei der Behandlung von *A. baumannii* verursachten Infektionen große Bedeutung beigemessen werden.

### 1.1 Infektionskrankheiten

Unter einer Infektion versteht man das aktive oder passive Eindringen, Anhaften und Vermehren von Krankheitserregern in einem Wirt. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sterben jährlich über 14 Millionen Menschen an Infektionskrankheiten, was sie zur weltweit häufigsten Todesursache macht. In den letzten Jahren haben nosokomiale Infektionen an Bedeutung zugenommen. Dabei handelt es sich um Infektionen, die innerhalb einer medizinischen Einrichtung erworben werden und die mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität verbunden sind. In Deutschland erkranken 5 – 20% [1] aller Patienten im Zeitraum ihrer Hospitalisierung an einer solchen Infektion. Damit ergeben sich etwa 500.000 Fälle jährlich [2, 3]. Trotz intensivmedizinischer Betreuung versterben 5 - 10% dieser Patienten an den Folgen der nosokomialen Infektion [3, 4].

### 1.2 Antibiotika

Nach der Entdeckung der ersten Antibiotika in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts konnte die Mortalität der Infektionskrankheiten erheblich verringert werden [5]. Durch gezielte Forschung wurde das Spektrum der verfügbaren Substanzen bis heute kontinuierlich erweitert. Mittlerweile sind über 8000 antibiotisch wirksame Substanzen bekannt, von denen aber nur noch circa 100 in der Praxis zur Anwendung kommen. Eingeteilt sind sie, nach ihrem molekularen Aufbau, in verschiedene Antibiotikaklassen. Zu den wichtigsten gehören  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Chinolone, Glykopeptid-Antibiotika, Tetracycline, Chloramphenicol, Makrolide, Lincosamide, Aminoglykoside, Sulfonamide, Nitroimidazole, Trimethoprim und Fosfomycin. Allen

Einleitung

Substanzen ist gemein, dass sie in Prozesse eingreifen, deren Ausfall für Bakterien entweder letal wirkt (bakterizide Wirkung) oder deren Reproduktionsfähigkeit herabsetzt (bakteriostatische Wirkung). Da diese Prozesse derart nur in Bakterien ablaufen, wirken Antibiotika selektiv toxisch.

### **1.3 Bakterielle Resistenzen**

Für die kausale Therapie schwerer bakterieller Infektionen sind Antibiotika von immenser Bedeutung. Sie haben in den letzten Jahren jedoch an Effektivität verloren [6]. Ursache hierfür ist die weltweite Zunahme und Ausbreitung der verschiedensten Antibiotikaresistenzen [7]. Die Prävalenz einzelner Resistenzen hat sich in der letzten Dekade vervielfacht [8] und immer häufiger treten multiresistente Keime auf, die gegen ein breites Spektrum verschiedenster Antibiotika resistent sind [9]. Von dieser Entwicklung betroffen sind sämtliche Wirkstoffklassen, einschließlich Reserveantibiotika, die sich in der Vergangenheit bei der Behandlung multiresistenter Erreger bewährt haben (z.B. Carbapeneme) [10]. Manche Erreger haben so viele Resistenzen akquiriert, dass keinerlei Option zur antibiotischen Therapie verbleibt [11]. Bakterien gelten als resistent gegenüber einem Antibiotikum, wenn dessen Konzentration am Infektionsherd nicht ausreicht, um eine Vermehrung des Erregers zu unterbinden. Man unterscheidet dabei natürliche und erworbene Resistenz. Als natürliche Resistenz bezeichnet man eine Unempfindlichkeit gegenüber einem Antibiotikum, welche alle Bakterien einer Gattung besitzen. So besitzen z. B. die meisten Gattungen gramnegativer Bakterien eine natürliche Resistenz gegenüber Penicillin. Alle Resistenzen eines Bakteriums, die über die natürliche Resistenz hinausgehen, werden als erworbene bezeichnet.

Bakterien haben unterschiedlichste Mechanismen entwickelt, um ihre Sensitivität gegenüber Antibiotika herabzusetzen. Diese Mechanismen lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen:

- 1: Abschirmen des Antibiotikums vom jeweiligen Wirkort
- 2: Inaktivierung der Substanz
- 3: Mutation der Zielstruktur des Antibiotikums
- 4: Enzymatische Modifikation der Zielstruktur
- 5: Realisierung eines alternativen Stoffwechselweges

## Einleitung

Hat ein Bakterium eine Resistenz erworben, so wird sich diese, unter entsprechender antibiotischer Behandlung, weiter ausbreiten. Eine Ausbreitung der Resistenz findet über klonale Expansion der resistenten Erreger statt, da diese ihren sensiblen Artgenossen gegenüber einen starken Selektionsvorteil besitzen. Eine Verbreitung der Resistenz durch horizontalen Gentransfer ist ebenfalls möglich. Häufig sitzen Gene, die eine Resistenz vermitteln, in mobilen genetischen Elementen, wie Transposons, IS-Elementen oder auf Plasmiden, die deren Austausch zwischen unterschiedlichen Spezies begünstigen. Zudem treten Resistenzgene häufig geballt in sogenannten Antibiotikaresistenzinseln auf, welche die Sensitivität der Keime gegen eine Vielzahl verschiedener Antibiotika herabsetzen und die als Ganzes auf andere Spezies übertragen werden können [12].

Ursache der Vermehrung und Ausbreitung erworbener Resistenzen ist in erster Linie der übermäßige und teils unsachgemäße Gebrauch von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin, der die Bakterien einem enormen Selektionsdruck aussetzt [13]. Die antibiotische Behandlung eines resistenten Erregers führt lediglich zur Eliminierung der natürlichen nicht-resistenten Bakterienpopulation und senkt so den Konkurrenzdruck auf den resistenten Keim. Dies ermöglicht dem Erreger eine weitere Ausbreitung und führt unweigerlich zum Versagen der Therapie.

### **1.4 *Acinetobacter* spp.**

Spezies der Gattung *Acinetobacter* (von griech. *akinētos* = unbeweglich, *baktron* = Stab) sind strikt aerobe, gramnegative, Katalase-positive, Oxidase-negative, unbewegliche, kokkoide Stäbchenbakterien, die nicht in der Lage sind Glukose zu fermentieren. Bei Betrachtung im Lichtmikroskop, werden die Bakterien meist paarweise oder in kleinen Gruppen zusammengelagert vorgefunden. Auf festen Nährböden bilden sie glatte, matte, gräuliche Kolonien.

## Einleitung



**Abbildung 1:** Kolonien von *Acinetobacter baumannii* auf einer Blutagarplatte (links); *Acinetobacter baumannii* im Lichtmikroskop nach Gram-Färbung (rechts)

Bei der Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoff und Energiequellen zeichnen sich die Spezies durch eine große metabolische Diversität aus [14, 15]. Sie kommen ubiquitär in der Umwelt vor, wie z.B. im Boden, in Oberflächengewässern oder Trinkwasser aber auch auf Nahrungsmitteln und auf der menschlichen Haut. Bis zu 25% der nicht-hospitalisierten Menschen tragen den Keim im Bereich der Achselhöhlen, der Inguinalregion, sowie im Interdigitalbereich der Füße. Dabei kann der Prozentsatz unter den hospitalisierten Personen noch erheblich höher sein [16].

Bis etwa 1970 wurden Spezies der Gattung *Acinetobacter* lediglich als seltene Auslöser nosokomialer Infektionen wahrgenommen [17]. In den folgenden Jahren stieg die Inzidenz von *Acinetobacter* spp. bedingten Infektionen jedoch so weit an, dass diese Gattung für hospitalisierte Personen überall auf der Welt eine ernste Bedrohung darstellte [18, 19]. Die immer häufiger auftretenden Ausbrüche auf Intensivstationen wurden zudem meist von multiresistenten Vertretern dieses Keims verursacht [18, 20].

Einzelne Spezies der heutigen Gattung *Acinetobacter* wurden vermutlich bereits im 19. Jahrhundert beschrieben, aber aufgrund ihrer heterogenen Morphologie selten in Zusammenhang gebracht. Sowohl die Gram-Färbung, als auch die Klassifikation in Stäbchen- oder Kokken-Bakterien gestaltete sich bei Vertretern der heutigen Gattung *Acinetobacter* häufig nicht eindeutig. Dies führte zu einer Vielzahl unterschiedlicher Bezeichnungen für diese Bakterien. Die gebräuchlichsten davon waren *Bacterium anitratum*, *Herella vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Micrococcus colcoacticus*, *Diplococcus*, B5W, *Cytophaga* und später *Moraxella*. Die Bezeichnung *Acinetobacter* setzte sich erst gegen 1984 durch, anfangs mit nur einer sehr begrenzten Anzahl Spezies [21]. Erst neue molekularbiologische Techniken erlaubten eine feinere Einteilung der Spezies der Gattung *Acinetobacter*, die phänotypisch nicht unterscheidbar waren. Bis heute wurden 32 Spezies beschrieben,

Einleitung

von welchen 19 namentlich benannt sind [15, 22]. Von diesen Spezies werden nur wenige als pathogen eingestuft. Auch wenn vereinzelt Spezies wie *A. Iwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii* sowie manche unbenannte Spezies für nosokomiale Ausbrüche verantwortlich gemacht wurden [23], so sind diese Fälle doch vergleichsweise selten. Weiterhin besitzen diese Spezies in der Regel nur wenige Resistenzen gegen Antibiotika und sind somit relativ leicht zu therapieren. Die Spezies mit der höchsten Inzidenz, dem durchschnittlich resistentesten Phänotyp und damit mit Abstand der größten klinischen Relevanz ist *Acinetobacter baumannii* [14].

## **1.5 *Acinetobacter baumannii***

### **1.5.1 Klinische Relevanz**

*A. baumannii* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, welches schwere Infektionen, insbesondere Pneumonie, Sepsis, Harnwegs- oder Wundinfekte, auslösen kann [24]. Ein ernster Krankheitsverlauf ist die Regel [25]. Die Mortalität einer *A. baumannii* bedingten nosokomialen Pneumonie liegt beispielsweise bei 30-75% [16]. Die Therapie Infizierter stellt sich aufgrund der weit verbreiteten Resistenzen in *A. baumannii* häufig schwierig dar. Vertreter dieser Spezies tragen neben zwei chromosomal kodierten  $\beta$ -Lactamasen eine ganze Reihe verschiedener Effluxpumpen, die teilweise überexprimiert werden können. Auch ihre äußere Zellmembran besitzt eine geringe Permeabilität für viele Antibiotika. Zusätzlich hat *A. baumannii*, in bemerkenswertem Ausmaß, die Fähigkeit, weitere Resistenzgene zu akquirieren. *Acinetobacter baumannii* gilt als „natürlich transformierbar“ und zeigt eine bis zu 100x stärkere Kompetenz als mit Calciumchlorid behandelte *Escherichia coli* Zellen [26]. So sind Ausbruchstämme häufig aufgrund weiterer erworbener Resistenzgene multiresistent. Auch Berichte über extremresistente bis hin zu panresistenten Stämmen mehren sich in den letzten Jahren [27, 28]. Die Vielfalt der, in *A. baumannii* beschriebenen, Resistenzdeterminanten ist immens [27]. Des Weiteren ist der Keim tolerant gegenüber Trockenheit. Er besitzt, anders als viele sonstige bakterielle Spezies, die Fähigkeit über mehrere Wochen auf trockenen Oberflächen zu überleben [29]. Auch gegenüber Desinfektionsmitteln besitzt er eine herabgesetzte Empfindlichkeit [30]. Seine Resistenz gegenüber Austrocknung, Desinfektionsmitteln und Antibiotika trägt dazu bei, dass *A. baumannii* über weite

Einleitung

Zeiträume im klinischen Umfeld überleben kann und begründet die Schwierigkeiten bei der Eindämmung von Ausbrüchen in medizinischen Einrichtungen.

### 1.5.2 Epidemiologie

*A. baumannii* ist in der Gesellschaft nicht weit verbreitet [31] und selbst besiedelte Menschen tragen meist nur sehr wenige Keime auf der Haut. Das Reservoir der Spezies in der Umwelt konnte noch nicht identifiziert werden [32]. Zu den Risikofaktoren, die eine Infektion durch *A. baumannii* begünstigen, zählen neben fortgeschrittenem oder extrem geringem Alter und geschwächtem Immunstatus auch lange Krankenhausaufenthalte, langwierige Antibiotikatherapien, vorangegangene chirurgische Eingriffe, Verbrennungen sowie Katheterisierung oder Intubation [33-35]. Da häufig mehrere dieser Faktoren bei Patienten unter intensivmedizinischer Behandlung zusammenkommen, ist *A. baumannii* auf Intensivstationen besonders weit verbreitet. Heute werden etwa 9% aller nosokomialen Infektionen im europäischen Raum durch *A. baumannii* verursacht und bis zu 41% der Patienten auf Intensivstationen sind kolonisiert [36-38]. Der Keim ist auch einer der häufigsten Auslöser nosokomialer Ausbrüche [14]. In den letzten beiden Jahrzehnten wurde eine Reihe teilweise verheerender Ausbrüche auf Intensivstationen mit Mortalitäten von bis zu 83% beschrieben [39, 40]. Die zunehmende Prävalenz des Keimes ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die steigende Anzahl intensivmedizinisch betreuter Patienten zurückzuführen.

### 1.5.3 Vektoren

Die Übertragung von *Acinetobacter* findet meist entweder durch kontaminierte Gegenstände, wie Beatmungsapparaturen und Wundversorgungsmaterial, statt oder der Keim wird durch ungenügende Hygienemaßnahmen vom Krankenhauspersonal von Patient zu Patient übertragen. Häufig sind auch alltägliche Gebrauchsgegenstände, wie Telefonhörer, Tastaturen oder Vorhänge, kontaminiert. Zur Vermeidung bzw. zur Eindämmung eines *Acinetobacter*-Ausbruchs sind aufgrund der hohen Überlebensfähigkeit und den vielfältigen Resistenzmechanismen strikte Hygienemaßnahmen von großer Bedeutung.

Einleitung

#### **1.5.4 Pathogenität**

*Acinetobacter baumannii* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium. Seine Pathogenitätsfaktoren sind allerdings bis heute Gegenstand nur weniger Untersuchungen gewesen und somit weitgehend unbekannt [24, 38]. Erwiesen ist, dass etwa 30% aller *Acinetobacter* Stämme durch die Produktion von Exopolysacchariden verkapselt sind [41]. Diese Keime sind einer Opsonisierung durch das Komplementsystem nicht mehr zugänglich, was die Effektivität der Immunantwort reduziert.

#### **1.5.5 Diagnostik**

Der Nachweis von *A. baumannii* erfolgt in der Routinediagnostik entweder aufgrund seiner Koloniemorphologie, seines Erscheinungsbildes im Lichtmikroskop oder auf Basis seiner Stoffwechselaktivität, die mit standardisierten Testreaktionen erfasst und zur Speziesidentifikation herangezogen werden kann. In den letzten Jahren wurde auch zunehmend die Massenspektrometrie zur Identifikation von *A. baumannii* eingesetzt. Für die folgende antibiotische Therapie ist die Erstellung eines Antibiogramms von Bedeutung. Dabei handelt es sich um die phänotypische Resistenzbestimmung eines Keimes gegen eine Vielzahl verschiedener Antibiotika. Das Antibiogramm wird mittels Agardiffusionstests oder automatisierten Testsystemen erstellt. Der Agardiffusionstest beruht darauf, dass Antibiotikum von einem Reservoir aus durch den Agar diffundiert und sich dadurch immer weiter verdünnt. Die Größe des Hemmhofes, der unbewachsenen Zone um das Reservoir herum, gibt Aufschluss darüber, wie sensibel der getestete Keim gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum ist. Automatisierte Testsysteme erfassen die Wachstumsgeschwindigkeit des zu testenden Isolates in verschiedenen Verdünnungen einer Antibiotikallösung. Das Resistenzverhalten des Keimes gegen verschiedene Antibiotika wird dann durch automatische Interpretation der Wachstumskurven bestimmt.

#### **1.5.6 Therapie**

Die Therapie von *Acinetobacter*-Infektionen gestaltet sich in vielen Fällen problematisch. Da im frühen Stadium der Behandlung noch kein Befund über die

Einleitung

Resistenz des Erregers vorliegt und somit auch noch unbekannt ist, welche Antibiotika sich effektiv dagegen einsetzen lassen, muss eine empirische antibiotische Therapie eingeleitet werden. Dabei wird aufgrund verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel dem Grundleiden des Patienten, dem vermuteten Infektionsherd oder der lokalen Resistenzsituation im Krankenhaus, eine antibiotische Therapie, mit der größtmöglichen Chance auf Erfolg, initiiert. Die Vielfalt der möglichen erworbenen Resistenzdeterminanten in *A. baumannii* führt häufig zu ungewöhnlichen und nicht vorhersagbaren Resistenzprofilen. Eine empirische Therapie birgt somit ein erhebliches Risiko auf ein Therapieversagen. Dennoch muss in Fällen ernster Infektionen, wie z.B. der Pneumonie oder Sepsis, eine solche eingeleitet werden [42, 43]. Antibiotika, die dabei häufig zum Einsatz kommen, sind (Acyl-) Aminopenicilline in Kombination mit einem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor, Carbapeneme, Aminoglykoside, Polymyxine, Glycyl- oder Tetracycline [44]. Ob es sich bei einer eingeleiteten empirischen Therapie um eine adäquate handelt, lässt sich erst nach Erstellung eines Antibiogramms ermitteln. Sofern kulturbasierte, phänotypische Analysemethoden, wie z.B. der Agar-Diffusionstest, zum Einsatz kommen, müssen für die Analyse etwa zwei Tage veranschlagt werden. Im Fall einer inadäquaten antibiotischen Therapie kann sich diese Verzögerung für den betroffenen Patienten als fatal erweisen. Eine frühere Therapieanpassung ist möglich, wenn molekularbiologische Methoden, wie z. B. Microarrays, zum Einsatz kommen.

### **1.5.7 Relevante Antibiotika und Resistenzen**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Resistenzverhalten von *A. baumannii* gegenüber einigen Antibiotika genauer untersucht. Diese Antibiotika und die entsprechenden Resistenzmechanismen werden im Folgenden ausführlich vorgestellt.

#### **$\beta$ -Lactam-Antibiotika**

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind die ersten Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum, die entdeckt wurden. Sie haben in der Mitte des 20. Jahrhunderts signifikant dazu beigetragen, die Mortalität von Infektionskrankheiten auf einen Bruchteil zu reduzieren [5]. Auch heute noch haben sie erhebliche klinische Bedeutung. So ist der

## Einleitung

weltweite Verbrauch an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika höher als der aller anderen Antibiotikaklassen zusammengenommen. Allen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist gemein, dass sie in ihrer Struktur einen viergliedrigen Lactam-Ring aufweisen. Aufgrund teils erheblicher Unterschiede in den Seitenketten lassen sie sich in verschiedene Gruppen einteilen. Zu diesen gehören die Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme. Der Wirkmechanismus all dieser Gruppen ist identisch.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hemmen die bakterielle Zellwandsynthese durch Bindung an sogenannte Penicillin-bindende Proteine (PBP). Zu den PBP gehören die Transpeptidasen, welche für die Quervernetzung von Peptidoglycanketten während der Zellwandsynthese verantwortlich sind. Ein Baustein der bakteriellen Zellwand und Substrat der Transpeptidasen ist D-Alanyl-D-Alanin. Ihre Wirksamkeit erhalten die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durch ihren  $\beta$ -Lactam-Ring, der ein Analogon zu D-Alanyl-D-Alanin darstellt. So sind sie dazu in der Lage, ins aktive Zentrum der Transpeptidasen zu gelangen und dort eine kovalente Bindung mit dem Enzym einzugehen, was zu dessen irreversibler Inhibition führt. Ist die Konzentration an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hoch genug um die Quervernetzung der Peptidoglycanketten zu unterbinden, so verliert die Zellwand ihre Zugfestigkeit. Da Bakterien unter hohem osmotischem Druck stehen führt dies zu ihrem Platzen.

Bakterien haben im Lauf der Zeit verschiedene Resistenzmechanismen gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika entwickelt. Hierzu zählen der aktive Export über Effluxpumpen, ein verändertes Expressionsmuster der PBP, Veränderungen der Membranpermeabilität und die Expression einer unempfindlichen Transpeptidase, welche allerdings nur unter grampositiven Bakterien weit verbreitet ist. Der mit Abstand wichtigste Mechanismus, insbesondere bei gramnegativen Keimen, ist aber die enzymatische Inaktivierung der Antibiotika durch  $\beta$ -Lactamasen [45]. Gemäß ihrem Reaktionsmechanismus bzw. ihrem Substratspektrum werden diese in verschiedene Klassen eingeteilt. Eine der gebräuchlichsten Klassifizierungen erfolgt nach Ambler [46]. Gemäß dieser sind die  $\beta$ -Lactamasen in die vier Klassen A-D eingeteilt. Klasse A beinhaltet verschiedene Enzyme deren Reaktionsmechanismus auf einem aktiven Serinrest im katalytischen Zentrum basiert. Alle Enzyme aus Klasse A weisen eine gewisse Homologie in ihrer Sequenz oder ihrer Struktur auf. Die meisten Enzyme dieser Klasse sind in der Lage Penicilline und Schmalspektrum-Cephalosporine zu hydrolysieren. Schließt ihr Substratspektrum auch Cephalosporine der 3. Generation ein, so werden sie als  $\beta$ -Lactamasen mit

## Einleitung

erweitertem Spektrum (ESBL) bezeichnet.  $\beta$ -Lactamasen, die auch Carbapeneme hydrolysieren können, werden auch als Carbapenemasen (CHBL) bezeichnet. In der Regel sind Enzyme der Ambler Klasse A empfindlich gegenüber  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Tazobactam. Vertreter dieser Klasse mit hoher Relevanz sind z.B. *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *KPC* und viele weitere. In Ambler Klasse B sind alle bekannten Metallo- $\beta$ -Lactamasen (MBL) eingeteilt. Anders als die Serin- $\beta$ -Lactamasen tragen diese zwei Zink-Atome, die über Histidinreste komplexiert sind, in ihrem katalytischen Zentrum. MBLs hydrolysieren alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit hoher Effizienz, einschließlich der Carbapeneme, allerdings ausschließlich der Monobactame. Sie werden grundsätzlich nicht von Inhibitoren beeinflusst die gegen Enzyme der Ambler Klasse A Wirkung zeigen. Die MBLs mit der höchsten Prävalenz sind *VIM*, *IMP* und *NDM*. Ambler Klasse C beinhaltet Serin- $\beta$ -Lactamasen, die mit denen aus Klasse A in ihrer Sequenz bzw. Struktur keine oder nur rudimentäre Ähnlichkeit aufweisen. Sie sind unsensibel gegenüber Inhibitoren und häufig chromosomal kodiert. Bekannt sind sie unter dem Namen *AmpC*. Die Sequenz des *bla<sub>ampC</sub>* Gens ist bei unterschiedlichen Organismen allerdings sehr variabel, so trägt es bei einigen Spezies einen eigenen Namen, z.B. *bla<sub>ADC</sub>* (*Acinetobacter derived Cephalosporinase*) in der Gattung *Acinetobacter*. Das Substratspektrum der Ambler Klasse C schließt in der Regel Penicilline, Monobactame und manche Cephalosporine ein. Die Aktivität gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation und Carbapenemen ist nur gering, kann aber, wenn weitere Faktoren wie Überexpression des Enzyms oder spezielle Punktmutationen hinzukommen, relevant werden. Die Ambler Klasse D besteht ebenfalls aus Serin- $\beta$ -Lactamasen die kaum inhibierbar sind und die wiederum nur geringe sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeiten mit den anderen Klassen aufweisen. Enzyme dieser Klasse tragen alle den Namen *bla<sub>OXA</sub>*, sind in ihrer Sequenz aber teilweise sehr divers [47] und unterscheiden sich auch signifikant in ihrem Substratspektrum [48]. Obwohl sich ihre Bezeichnung von ihrer Fähigkeit Oxacillin zu hydrolysieren ableitet haben nicht alle Enzyme der Ambler Klasse D diese Fähigkeit. Einige Vertreter dieser Klasse sind auch als ESBL oder CHBL klassifiziert, während andere ein vergleichsweise schmales Substratspektrum besitzen. Aus diesem Grund ist es bei der Diagnostik wichtig verschiedene Subtypen von *bla<sub>OXA</sub>* Genen zu differenzieren.

Einleitung

### Piperacillin/Tazobactam

Das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Piperacillin gehört zu den Acylaminopenicillinen, auch Ureidopenicilline genannt, und besitzt innerhalb dieser Gruppe das breiteste Wirkungsspektrum. Es ist somit auch wirksam gegen *Acinetobacter*. Nachteilig ist die geringe Stabilität gegenüber bakteriellen  $\beta$ -Lactamasen. Aus diesem Grund wird Piperacillin häufig in Kombination mit dem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor Tazobactam verabreicht. Dieser Inhibitor ist allerdings nur gegen Enzyme der Ambler Klasse A effektiv und selbst innerhalb dieser Gruppe wurden in den letzten Jahren Inhibitor-resistente Varianten beschrieben [49]. Die häufigsten Ursachen einer Resistenz gegen Piperacillin/Tazobactam in *Acinetobacter* sind Inhibitor-resistente  $\beta$ -Lactamasen der Klasse A, MBLs aus Klasse B, sowie überexprimierte Enzyme der Klassen C und D.

### Ceftazidim

Ceftazidim gehört zur Klasse der Cephalosporine. Der erste Vertreter dieser Substanzklasse wurde um 1945 erstmals aus dem Schimmelpilz *Acremonium chrysogenum* (ehemals *Cephalosporium acremonium*) isoliert. Durch chemische Modifikation wird heute eine Vielzahl von Derivaten der ursprünglichen Substanz mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften hergestellt. Ceftazidim wird zur Gruppe der Cephalosporine der 3. Generation gezählt. Als solches besitzt es eine höhere Stabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen als die Penicilline, sowie die Cephalosporine der 1. und 2. Generation. Auch die Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien ist erhöht, im Vergleich zu Substanzen der 1. und 2. Generation. Eine Resistenz gegen Ceftazidim wird vermittelt durch ESBLs der Ambler Klasse A und D, alle  $\beta$ -Lactamasen der Klasse B und überexprimierte Enzyme aus Klasse C

### Imipenem und Meropenem

Ebenfalls in die Klasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören Imipenem und Meropenem. Diese beiden Antibiotika sind Vertreter der Carbapeneme. Der erste Vertreter dieser Klasse wurde 1976 aus *Streptomyces cattleya* isoliert und dessen antibakterielle Wirkung festgestellt. Heute werden Carbapeneme in der Regel voll-synthetisch hergestellt. Sie besitzen eine stark erhöhte Stabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen sowie ein äußerst breites Wirkungsspektrum. Carbapeneme sind Reserveantibiotika und häufig die letzte Option zur Therapie multiresistenter Keime. Sie zählen somit zur

Einleitung

sogenannten *last line of defence*. Ihre Anwendung ist bestimmten, schwer beherrschbaren Infektionszuständen vorbehalten. Bei unkritischem Einsatz werden Resistenzen gefördert und Nebenwirkungen provoziert. Unter den  $\beta$ -Lactamasen ist nur ein geringer Anteil der Enzyme dazu in der Lage, Carbapeneme in relevantem Maßstab zu hydrolysieren. Aus diesem Grund können Carbapeneme auch häufig zur Therapie multiresistenter Erreger erfolgreich eingesetzt werden. Einige wenige Enzyme der Ambler Klasse A und D zählen zu den Carbapenemasen. Da diese allerdings nur relativ schwach aktiv gegen Carbapeneme sind, prägt sich eine phänotypische Resistenz in der Regel nur aus, wenn sie überexprimiert werden. Metallo- $\beta$ -Lactamasen können Carbapeneme mit hoher Effizienz hydrolysieren, während sich in Klasse C keine in *A. baumannii* vorkommenden Enzyme mit Carbapenemase-Aktivität befinden.

Gentamicin, Tobramycin und Amikacin

Gentamicin, Tobramycin und Amikacin sind die drei am häufigsten eingesetzten Vertreter der Aminoglykosid-Antibiotika. Stoffe dieser, auch als Aminoglykoside bezeichneten, heterogenen Substanzklasse bestehen aus meist stark modifizierten, glykosidisch verknüpften Zuckereinheiten. Sie werden in der Regel aus Streptomyceten isoliert und ggf. noch chemisch modifiziert. Aminoglykosid-Antibiotika wirken stark bakterizid durch Hemmung der Proteinbiosynthese, indem sie an die 30S-Untereinheit der Ribosomen binden und Ablesefehler der mRNA verursachen. Dadurch werden fehlerhafte Proteine gebildet, die nicht in der Lage sind ihre biologische Funktion auszuüben. Die bakterizide Wirkung der Aminoglykoside wird durch ihre Fähigkeit die Integrität der bakteriellen Zellmembran zu zerstören noch verstärkt [50]. Ihre therapeutische Anwendung ist durch ernste Nebenwirkungen, insbesondere eine generelle Ototoxizität, limitiert. Bedingt durch ihre Wirksamkeit, insbesondere im gramnegativen Bereich, gehören die Aminoglykoside dennoch zu den wichtigsten Antibiotika im klinischen Alltag.

Die am weitesten verbreiteten Resistenzmechanismen gegen Aminoglykoside sind enzymatische Modifikation der ribosomalen Bindestelle, aktiver Export des Antibiotikums durch Pumpen und Inaktivierung der antibiotischen Substanzen durch enzymatische Modifikation. In *Acinetobacter* spielt aktiver Transport, z.B. durch das überexprimierte Effluxsystem *adeABC*, nur vergleichsweise selten eine Rolle. Häufiger ist die z.B. durch *ArmA* vermittelte Methylierung der Ribosomen Ursache

## Einleitung

einer Resistenz gegen Aminoglykoside. Mit Abstand der häufigste Mechanismus ist jedoch die enzymatische Inaktivierung der Substanzen durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME). Diese sind eingeteilt nach der Art der Modifikation die sie katalysieren. Von Bedeutung sind Acetyltransferasen (*aac*), Phosphotransferasen (*aph*) und Nukleotidyltransferasen (*ant*). Die Substratspektren der einzelnen Enzyme können sich auch innerhalb der gleichen Enzymklasse erheblich unterscheiden. In manchen Fällen können selbst einzelne Punktmutationen Einfluss darauf nehmen welches Aminoglykosid modifiziert werden kann und welches nicht [51].

## Ciprofloxacin

Seit der Entdeckung der antibakteriellen Wirkung der Chinolone 1962 wurde eine Vielzahl verschiedener Derivate entwickelt. Eine erhebliche Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften erbrachte die Fluoridierung des enthaltenen Benzol-Rings. Zu diesen sogenannten Fluorchinolonen zählt auch Ciprofloxacin. Sowohl die Chinolone, als auch die Fluorchinolone nutzen als Wirkprinzip ihre hemmende Wirkung auf die bakterielle Topoisomerase II, auch Gyrase genannt, weshalb sie früher auch als Gyrasehemmer bezeichnet wurden. Weiterentwickelte Fluorchinolone inhibieren darüber hinaus auch die bakterielle Topoisomerase IV. Beide Enzyme beeinflussen den Grad der Verdrillung der DNA und sind essentiell für deren Replikation. Eine Inhibition der Enzyme führt zu Strangbrüchen und wirkt somit letal auf die betroffenen Bakterien. Resistenzen gegen Ciprofloxacin und andere Fluorchinolone werden in der Regel durch Punktmutationen in der Gyrase und Topoisomerase IV verursacht. Eine Reihe von relevanten Punktmutationen in den entsprechenden Genen *gyrA* und *parC* in *Acinetobacter* sind bis heute beschrieben worden [52-54].

## Trimethoprim/Sulfamethoxazol

Trimethoprim und das Sulfonamid Sulfamethoxazol werden wegen ihrer synergistischen Wirkung in der Regel im Verhältnis 1:5 als Kombinationspräparat verabreicht. Der Synergismus beruht darauf, dass beide Antibiotika die Folsäuresynthese inhibieren, welche sie an unterschiedlichen Schritten blockieren. Trimethoprim ist ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolatreduktase während Sulfamethoxazol die Dihydropteroatsynthese inhibiert. Beide Enzyme sind essentiell für die Folsäuresynthese, welche in Bakterien benötigt wird, um Nukleotide zu

## Einleitung

synthetisieren. Da Folsäure von Bakterien in der Regel nicht von externen Quellen aufgenommen werden kann, führt die Blockade der Folsäuresynthese zu einem Mangel an Nukleotiden, so dass keine DNA Replikation mehr möglich ist. Diese ist Grundlage für die Zellteilung, so dass Trimethoprim und Sulfamethoxazol bakteriostatisch wirken. Eine Resistenz gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol kann nur auftreten, wenn Resistenzmechanismen gegen beide Antibiotika ausgeprägt sind. Die Inaktivierung nur einer Substanz hebt die Blockade des Folsäurestoffwechsels nicht auf. Die Trimethoprim-Resistenz kann in *Acinetobacter* viele verschiedene Ursachen haben und auch aus dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren entstehen. Zu diesen zählen Effluxpumpen wie z.B. *AbeM*, Veränderungen der äußeren Membran oder Mutationen in der Dihydrofolatreduktase. Eine starke Resistenz gegen Trimethoprim vermittelt die Expression des *dfrA* Gens, welches für eine alternative, nicht inhibierbare Dihydrofolatreduktase kodiert. Die mit Abstand häufigste Ursache einer Sulfamethoxazol-Resistenz sind die Resistenzgene *sul1* und *sul2*. Beide kodieren für eine nicht durch Sulfamethoxazol inhibierbare Dihydropteroatsynthase.

## Tigecyclin

Bei Tigecyclin handelt es sich um ein Glycylcyclin und damit um eine Weiterentwicklung der klassischen Tetracycline. Die erst 2005 zugelassene Substanz bindet an die 30S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und inhibiert dadurch die Proteinbiosynthese. Durch die Inhibition der Translation wirkt Tigecyclin bakteriostatisch. Es besitzt ein breites Wirkungsspektrum und wird nicht beeinflusst von vielen bakteriellen Mechanismen, die zur Ausprägung einer Resistenz gegen klassische Tetracycline führen. So haben z.B. weit verbreitete Resistenzgene wie *tetA* oder *tetB* keinerlei Effekt auf Tigecyclin. Das Effluxsystem *adeABC* dagegen ist dazu in der Lage Tigecyclin, in begrenztem Umfang, aus der bakteriellen Zelle auszuschleusen. Eine Überexpression einzelner Komponenten dieses Systems, wie sie bei Mutationen in den Regulatorgenen *adeR* und *adeS* auftreten kann, führt jedoch zu einem signifikanten Resistenzgrad.

## Colistin

Colistin ist ein Polymyxin und gehört somit in die Gruppe der Polypeptidantibiotika. Obwohl Colistin seit 1959 als Antibiotikum zur Verfügung steht, wurde es über viele

## Einleitung

Jahre hinweg aufgrund seiner erheblichen Nephro- und Neurotoxizität nur sehr restriktiv eingesetzt. Durch die Zunahme der Infektionen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien in den letzten Jahren hat es allerdings an Bedeutung gewonnen. Bei vielen Infektionen mit extrem resistenten Keimen verbleibt Colistin als letzte therapeutische Option. Die antibakterielle Wirkung des Colistins begründet sich auf seiner Fähigkeit die Integrität der bakteriellen Zellmembran zu zerstören. Voraussetzung für die Interaktion des Colistins mit der Membran ist das Vorhandensein von Lipopolysacchariden (LPS), was bei fast allen gramnegativen Bakterien der Fall ist. Durch die Auflösung der Zellmembran wirkt Colistin bakterizid. Colistin-resistente Keime treten sporadisch auf, sind aber noch sehr selten [55, 56]. Der Mechanismus der Colistin-Resistenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen an resistenten Stämmen deuten aber darauf hin, dass der Verlust der LPS daran beteiligt ist [57-60]. Dieser Verlust geht mit erheblichen Einbußen der Resistenz gegenüber anderen Antibiotika oder Umwelteinflüssen einher. Eine Ausbreitung Colistin-resistenter Stämme ist aufgrund ihrer somit stark herabgesetzten Konkurrenzfähigkeit im außerklinischen Umfeld unwahrscheinlich.

### **1.6 Genotypische Resistenzdetektion**

Die gegenwärtig eingesetzten Methoden zur phänotypischen Resistenzanalyse von Bakterien sind kulturbasiert und somit langwierig. Die Wachstumsrate der Bakterien ist limitiert und eine Beschleunigung des Verfahrens somit nicht möglich. Der Genotyp eines Bakterienstammes lässt sich mittels molekularbiologischer Methoden dagegen erheblich schneller bestimmen. Da die Ursache jeder phänotypischen Resistenz im Genom des Bakteriums liegt, lässt sich in der Regel anhand des Genotyps die phänotypische Resistenz ableiten. Voraussetzung hierfür ist, dass der Resistenzmechanismus bekannt ist. Methoden die zur Detektion von Resistenzdeterminanten in bakteriellen Genomen in Frage kommen sind gesamtgenomische Sequenzierung, PCR-Amplifikation und DNA-Microarrays. Während die Sequenzierung ganzer Genome vergleichsweise aufwändig und teuer ist, so ist die PCR-Amplifikation einzelner Resistenzdeterminanten äußerst schnell und günstig. Allerdings muss dabei jede Determinante separat nachgewiesen werden, was bei einer Vielzahl von Möglichkeiten nicht praktikabel ist. Eine schnelle und relativ günstige Alternative zur simultanen Detektion einer Vielzahl von Resistenzfaktoren ist die Untersuchung mittels DNA-Microarrays.

Einleitung

## 1.7 DNA-Microarray-Technologie

Ein DNA-Microarray ist ein analytisches Instrument zur Untersuchung einer komplexen DNA-Probe. Typischerweise trägt er einige hundert bis mehrere tausend Sonden, von denen jede spezifisch eine Zielsequenz in der Proben-DNA detektieren kann. Sonden sind DNA-Stränge, die revers-komplementär zu ihrer Zielsequenz sind und in einem genau festgelegten Muster auf einer planaren Oberfläche immobilisiert werden. Somit lässt sich jede Sonde anhand ihrer genauen Position identifizieren. Ihre Länge variiert je nach Anwendung von unter zwanzig bis zu vielen hundert Basen. Das Funktionsprinzip aller Microarrays besteht darin, dass die Sonden gemäß der Watson-Crick Basenpaarung mit ihrer Zielsequenz innerhalb der Proben-DNA hybridisieren und diese auf dem Array immobilisieren. Über Fluoreszenzmarkierung oder Kopplung einer enzymatischen Reaktion kann die gebundene DNA optisch detektiert werden. Die Signalstärke jeder Sonde gibt dabei Aufschluss, ob und in welcher Menge die Zielsequenz in der Probe vorgelegen hat. Aufgrund ihrer Fähigkeit in kürzester Zeit tausende DNA-Abschnitte zu quantifizieren hat sich der Einsatz der Microarraytechnologie bei der Genexpressionsanalyse bewährt. In den letzten Jahren hat sie aber auch ihren Nutzen bei der Genotypisierung von Pathogenen unter Beweis gestellt. So wurde eine erhebliche Anzahl DNA-Microarrays zur Detektion von Pathogenitätsfaktoren und Resistenzgenen sowie zur Identifizierung und Typisierung von medizinisch relevanten Keimen entwickelt [61-66]. Auch wenn einige dieser Arrays zur Detektion typischer gramnegativer Resistenzfaktoren geeignet sind [67], so ist doch keiner dafür ausgelegt Resistenzgene spezifisch im Genom von *Acinetobacter baumannii* nachzuweisen.

## 2. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Prävalenz von Infektionen mit *Acinetobacter baumannii*, insbesondere mit multiresistenten Vertretern dieser Spezies, hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Bei schweren Infektionen ist eine sofortige antibiotische Therapie unerlässlich. Eine kulturbasierte, phänotypische Charakterisierung dieser Keime benötigt, abhängig von ihrem Wachstumsverhalten, mindestens zwei Tage, was zu einer verzögerten adäquaten Therapie führen kann. Ziel dieser Arbeit ist es, einen diagnostischen Microarray zu entwickeln, der dazu in der Lage ist, das Resistenzverhalten von *Acinetobacter baumannii* binnen weniger Stunden zu bestimmen. Voraussetzung hierfür ist, dass der Array einen möglichst großen Anteil des Repertoires an Resistenzfaktoren von *A. baumannii* detektieren kann. Die Entwicklung des Arrays beinhaltet die Auswahl der Zielgene, die Erstellung von Primern und Sonden zu deren Amplifikation bzw. Detektion und die Ermittlung der optimalen Multiplex-PCR- und Hybridisierungsparameter. Die Validierung des Systems mit einer hinreichend großen Kollektion an klinischen Isolaten ist ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Die Ergebnisse der Array-Analyse sollen mit den Resultaten der konventionellen, kulturbasierten Methoden verglichen werden, um die Verlässlichkeit des Arrays zu bewerten. Anhand dieser Daten lassen sich die Sensitivität und die Spezifität ermitteln. Diese haben sich in der Vergangenheit als valide Bewertungskriterien für die Leistungsfähigkeit von Microarrays erwiesen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

In den folgenden Tabellen sind in dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits, Lösungen, Medien, Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien und Bakterienstämme aufgelistet.

##### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Chemikalien und deren Hersteller findet sich in Tabelle 1. Die Stoffe wurden gemäß Herstellerangaben gelagert und innerhalb der Mindesthaltbarkeit verbraucht.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Enzyme**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	BD Bacto™ Hefeextrakt
	BD Bacto™ Trypton
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Agarose
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Essigsäure
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	Kaliumchlorid
	Natriumchlorid
	Tri-Natriumcitrat Dihydrat
	TRIS
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
	DNA-Ladepuffer #R0611
	GeneRuler 1kb DNA-Standard #SM1333
	Cy3-dCTP
GE Healthcare, München	
Invitrogen GmbH, Darmstadt	SYBR® Gold Nucleic Acid Stain
Merck KGaA, Darmstadt	Glycerin p.a. 87%
	Salzsäure 37%
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Exonuklease I

## Material &amp; Methoden

	Mungbohnen-Nuklease
Schott Technical Glass Solutions GmbH, Jena	Nexterion Block E
	Nexterion Spot I
	Nexterion Spot Modified
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Ethidiumbromid
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Triton X-100
Thermo Scientific (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)	Phusion GC Reaction Buffer 5-fach
	Phusion DNA Polymerase

---

### 3.1.2 Kits

Kommerziell bezogene Kits sind in Tabelle 2 gelistet. Wenn vom Hersteller gefordert, wurden einzelne Komponenten mit Ethanol supplementiert.

**Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Kits**

Bezugsquelle	Bezeichnung
Agilent Technologies GmbH, Böblingen	Agilent DNA 1000 Kit
Analytik Jena, Jena	innuPREP Bacteria DNA Kit
Applied Biosystems, Foster City, USA	ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen	DiversiLab LabChip Kit für Acinetobacter
Qiagen GmbH, Hilden	QIAquick® PCR Purification Kit
	DNeasy Blood & Tissue Kit
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Roche Nucleic Acid Isolation Kit I

### 3.1.3 Lösungen und Medien

Zur Herstellung aller Lösungen und Puffer wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. einzelne thermolabile Komponenten sterilfiltriert.

**Tabelle 3: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>TAE Puffer</b>	
TRIS	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	2 mM
<b>SSC Puffer (20x) (pH 7.0)</b>	
NaCl	3 M
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,3 M
<b>Waschpuffer I</b>	
SSC	2x
SDS	0,2% (v/v)
<b>Waschpuffer II</b>	
SSC	2x
<b>Waschpuffer III</b>	
SSC	0,2x
<b>Rinse I</b>	
Triton X100	0,1% (v/v)
<b>Rinse II</b>	
HCl	1 mM
<b>Rinse III</b>	
KCl	100 mM
<b>Blocking-Lösung</b>	
Nexterion Block E	1x
HCl	2 mM
<b>Spotting Puffer (2x)</b>	
Nexterion Spot I	1x
Nexterion Spot modified (Spot III)	1x
<b>LB Kulturmedium (2x), pH 7.0</b>	
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	10 g/l
<b>LB Agar</b>	
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
Agar	15 g/l
<b>Ethidiumbromid-Gelbad</b>	
Ethidiumbromid	1 µg/ml in 1x TAE
<b>TFBI-Lösung (pH 5,8)</b>	
Calciumchlorid	10 mM
Kaliumacetat	30 mM
Manganchlorid	50 mM
Rubidiumchlorid	100 mM
Glycerin	15%
Essigsäure	bis pH 5,8 erreicht

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>TFBII-Lösung (pH 6,5)</b>	
Calciumchlorid	75mM
MOPS	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
Glycerin	15%
Natronlauge	bis pH 6,5 erreicht

### 3.1.4 Geräte

**Tabelle 4: Verwendete Geräte**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
Agilent Technologies GmbH, Böblingen	Agilent 2100 Bioanalyzer
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Elektrophorese Netzteil EPS 301
ArrayIt Microarray Technology, Sunnyvale, USA	SMP3 Split Pins
Biomed Analytik GmbH, Göttingen	Agagel Mini Biometra Gel System
BioRobotics, Cambridge, Großbritannien	MicroGrid II Spotter 610
Bruker Daltonik GmbH, Bremen	MALDI Biotyper
Eppendorf AG, Hamburg	Thermomixer Comfort
GE Healthcare GmbH, München	Biacore T200
Heraeus Holding GmbH, Hanau	Heraeus Pico 17 Centrifuge
	Heraeus Megafuge 1.0
	Heraeus Fresco 17 (Rotor 75003424)
	Heraeus Multifuge 3S-R (Rotor 6445)
IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen	Magnetrührer IKAMAG RCT
Jasco Deutschland GmbH, Groß-Umstadt	Spektrophotometer Jasco V630
M. Zipperer GmbH, Staufen	Horizontalschüttler
MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning	Axon GenePix 4300A Scanner
Mettler-Toledo GmbH, Gießen	pH-Meter SevenEasy
MJ Research, Waltham, USA	ThermoCycler PTC-200
NeoLab, Heidelberg	Heizblöcke
New Brunswick Scientific, Edison, USA	Schüttelinkubator innova® 44
Raytest GmbH, Straubenhardt	Fluoreszenzscanner Fujifilm FLA5100
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Roche MagNA Pure Compact
Sartorius AG, Göttingen	Waagen
Systec GmbH, Wettenberg	SYSTEC VE-95
Thermo Scientific (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)	Nanodrop
VWR International GmbH, Darmstadt	Pipetten
VWR International GmbH, Darmstadt	Analog Vortexer Mixer

### 3.1.5 Software

**Tabelle 5: Verwendete Software**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Microsoft Office 2010
Integrated DNA Technologies Inc., München ( <a href="http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/">http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/</a> )	IDT Oligo Analyzer 3.1
MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning	GenePixPro 7.0.2
BioRobotics, Cambridge, Großbritannien	TAS Application Suite v2.7.1.18
National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a> )	Genbank
National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> )	Blast

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Materialbezeichnung</b>
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	PCR Softstrips (200 µl)
Eppendorf AG, Hamburg	1,5 ml/ 2,0 ml Reaktionsgefäße
Erie Scientific Company, Portsmouth, USA	LifterSlip 25mm x 25mm
GE Healthcare GmbH, München	Sensor Chip CM5
Genetix, New Milton, United Kingdom	384-Well Mikrotiterplatten(V-Boden)
Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim	Columbia Blutagar Platten
Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg	Columbia Blutagar
Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	MAST CRYOBANK™
Schott Technical Glass Solutions GmbH, Jena	Schott Nexterion Slide E
Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach	Pipettenspitzen

### 3.1.7 Bakterielle Stämme und Isolate

Tabelle 7: Verwendete Referenzstämme und -isolate

Herkunft	Spezies	Bezeichnung	Positivkontrolle für Resistenzgene
RBK	<i>Klebsiella</i> spp.	RBK491122	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RBK375 / 08	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RBK491985	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
	<i>Escherichia coli</i>	RBK445421	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	RBK697554.2	<i>sul2</i>
	<i>Acinetobacter</i> spp.	RBK22ACS	<i>aac(6')-Ib</i>
NIPH	<i>Acinetobacter baumannii</i>	HK302	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
ATCC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AYE	<i>adeB</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>gyrA</i> , <i>arr</i> , <i>strA</i> , <i>intl</i> , <i>cmIA</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>strB</i> , <i>sul-1</i> , <i>craA</i> , <i>aac(3)-I</i> , <i>dfrA-1</i> , <i>ISAb1</i> , <i>qacE</i> , <i>catI</i> , <i>adeR</i> , <i>dfrA-10</i> , <i>adeS</i> , <i>tetG</i> , <i>abeM</i> , <i>aph(3')-I</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>bla</i> <sub>VEB</sub> , <i>tetA</i> , <i>flor</i> , <i>ISAb1-bla</i> <sub>ADC</sub> , <i>parC</i> , <i>bla</i> <sub>ADC</sub>
NRZ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRZ-00638	<i>bla</i> <sub>IMP-7</sub>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00002	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>IS1133</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00066	<i>bla</i> <sub>OXA-23-ISAba1</sub>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00484	<i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> , <i>aac(6')-IL</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00817	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>bla</i> <sub>ADC N283S</sub>
UB	<i>Enterococcus faecalis</i>	RE25	<i>APH3</i> , <i>tetM</i>
	<i>Escherichia coli</i>	pRT11	<i>tetB</i>
	<i>Escherichia coli</i>	DHMB	<i>bla</i> <sub>IMP2</sub>
AHVLA	<i>Escherichia coli</i>	B2315	<i>bla</i> <sub>PSE</sub> , <i>catB</i> , <i>intl</i> , <i>qnrA</i>
	<i>Escherichia coli</i>	B2325	<i>strA</i> , <i>strB</i>
	<i>Escherichia coli</i>	B2326	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
	<i>Escherichia coli</i>	B2327	<i>qnrB</i>

RBK – J. Weile, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland

NIPH – A. Nemeč, National Institute of Public Health, Prag, Tschechische Republik

ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, USA

NRZ – M. Kaase, Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger, Bochum, Deutschland

UB – V. Perreten, Universität Bern, Bern, Schweiz

AHVLA – M. Anjum, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Waybridge, Großbritannien

Neben den in Tabelle 7 angegebenen Referenzstämmen wurden auch 28, mit dem Plasmid pUC57 transformierte, *E. coli* DH5 $\alpha$  Stämme als Positivkontrollen eingesetzt. Jedes dieser 28 Plasmide trug innerhalb des enthaltenen *lacZ* Gens eine Insertion, deren Sequenz der eines Resistenzgens entsprach. Anwendung fanden derartige Positivkontrollen für die Gene *aac(6')-IL*, *aac(6')-Is*, *aac(6')-Iad*, *aac(6')-Ih*, *aac(3)-II*, *aac(3)-IV*, *ant(3)-Ia*, *ant(3)-Ie*, *ant(3'')-(9)*, *tetL*, *tetH*, *tet(39)*, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SCO</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-37</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>CARB-5</sub>, *armA*, *dfrA7*, *dfrA12* und zwei verschiedene Mutationen des Gens *bla*<sub>ADC</sub>.

## Material & Methoden

Ebenfalls Verwendung fanden 56 klinische Isolate der Spezies *Acinetobacter baumannii*, die vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger bereitgestellt wurden, sowie 23 Isolate der Gattung *Acinetobacter* (2 davon *A. baumannii*) die vom Robert-Bosch-Krankenhaus zur Verfügung gestellt wurden.

### 3.1.8 DNA-Proben

In dieser Arbeit wurde die DNA zweier Stämme analysiert, die nicht in Kultur vorlagen. Von diesen wurde eine DNA-Probe von Dr. Iglauer (Labor Dr. Fenner & Kollegen, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Bei diesen handelt es sich um die Ausbruchstämme AC8 und AC9.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Speziesidentifikation

Klinische Isolate, die der Routinediagnostik des mikrobiologischen Labors des Robert-Bosch-Krankenhauses entstammen, wurden anhand ihrer Koloniemorphologie, ihrem Wachstumsverhalten auf verschiedenen Nährmedien bzw. Temperaturen und biochemischen Tests identifiziert. Bei nicht eindeutigem Befund wurden diese mittels des API NE Systems oder mittels des automatisierten Systems VITEK2, unter Verwendung von GN ID-Karten, identifiziert. Die Speziesidentifikation vorcharakterisierter Stämme aus anderen Quellen wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization – Time-Of-Flight Mass-Spectrometry*; MALDI-TOF MS) mittels des MALDI Bioanalysers bestätigt.

### 3.2.2 Anlegen von Kryokulturen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in Form von Kryokulturen gelagert. Hierfür wurde eine einzelne Kolonie des jeweiligen Stammes mit einer sterilen Impföse in ein Lagergefäß des *MAST Cryobank* Systems überführt und bei -20°C eingefroren.

### 3.2.3 Antibiotika Sensitivitätstestung

Ein vollständiges Antibiogramm jedes Stammes von *Acinetobacter* spp. wurde mittels des automatisierten Testsystems *VITEK2*, unter Verwendung des *AST-N248* Kartentyps, ermittelt. Das System bestimmt über die Wachstumsrate des jeweiligen Keims in Anwesenheit verschiedener Antibiotika dessen Sensitivität und gibt aus, ob ein Schwellenwert der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für das jeweilige Antibiotikum erreicht wurde. Dieser Schwellenwert ist nach deutscher Industrienorm (DIN) festgelegt und gibt an, ob der vorliegende Keim als sensibel, intermediär resistent oder resistent einzustufen ist. Betrachtete Antibiotika sind Piperacillin/Tazobactam (PIP/TAZ), Ceftazidim (CZ), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Amikacin (AMK), Gentamicin (GEN), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Tigecyclin (TGC), Colistin (COL) und Trimetoprim/Sulfamethoxazol (SXT).

### 3.2.4 DNA-Extraktion

Stämme aller eingesetzten Spezies wurden zur DNA-Extraktion mittels einer sterilen Impföse aus ihrer Kryokultur auf LB- oder Blutagarplatten ausgestrichen. Nach einem Inkubationsschritt über Nacht wurden 2-5 der gewachsenen Kolonien der DNA-Extraktion zugeführt. Die Isolierung von gesamtgenomischer DNA wurde entweder mittels des *DNeasy Blood & Tissue Kit*, gemäß des Protokolls für gramnegative Bakterien oder mittels des automatisierten *MagNA Pure Compact* Systems durchgeführt. Hierzu wurde dieser mit Verbrauchsmaterialien des *Nucleid Acid Isolation Kit I* bestückt und nach Einsatz in Wasser dispergierter gramnegativer Bakterien gestartet. Das System isoliert binnen 20 min typischerweise circa 2,5 µg DNA. Stammlösungen dieser wurden zur längerfristigen Lagerung bei -20°C eingefroren, Gebrauchslösungen auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt und bei 4°C gelagert.

### 3.2.5 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation aller Zielregionen des Microarrays erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Je nach Verwendungszweck der generierten Amplifikate kamen dabei die konventionelle, Gradienten-, Labeling- oder Multiplex-PCR bzw. Kombinationen dieser PCR-Varianten zum Einsatz.

## Material & Methoden

### Konventionelle PCR

In der konventionellen PCR wird in jedem Ansatz ein einziges, nicht markiertes Produkt generiert. Sofern im Einzelfall nicht anders angegeben wurden alle PCRs nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

GC-Reaction Buffer	1×
dNTPs	je 50 µM
Phusion Polymerase	20 mU/µl
Template DNA	1 ng/µl
Primer	je 0,5 µM

Die Zyklusbedingungen im *Mastercycler* PCR-Gerät waren dabei:

2 min	97°C	} 35 Zyklen
30 s	97°C	
30 s	60°C	
45 s	72°C	
5 min	72°C	

### Gradienten-PCR

Das Pipettierschema für den Ansatz einer Gradienten-PCR unterscheidet sich nicht von dem einer konventionellen PCR. Während dem Lauf wird allerdings im *Annealing*-Schritt ein Temperaturgradient angelegt, so dass verschiedene Ansätze simultan bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert werden können. Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, wenn der Einfluss der Annealing-Temperatur auf das Verhalten der Reaktion untersucht werden soll. In dieser Arbeit wurden Gradienten-PCRs mit jeweils fünf gleichen PCR-Ansätzen bei den Annealing-Temperaturen 57°C, 60°C, 63°C, 65,5°C und 67°C durchgeführt.

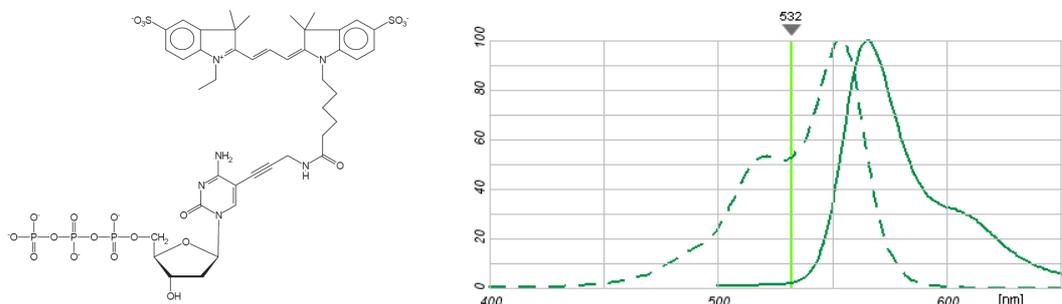
### Labeling-PCR

Voraussetzung dafür, dass ein PCR-Produkt nach Hybridisierung auf einem Microarray mittels eines Fluoreszenzscanners detektiert werden kann, ist, dass das Produkt vorher mit einem Fluorophor versehen wurde. In der sogenannten Labeling-PCR gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten hierfür. Entweder eines der

## Material & Methoden

Desoxyribonukleotide oder die eingesetzten Primer werden an ihrem 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Cyanin-Farbstoffe wie Cy3 haben sich hinsichtlich Quantenausbeute, Stabilität und Prozesskompatibilität als besonders geeignet erwiesen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit dem Cyaninfarbstoff Cy3 gearbeitet, welches in der Regel gekoppelt an dCTP in die PCR eingesetzt wurde. Hierfür wurden 40% des in dem PCR-Ansatz enthaltenen dCTPs durch Cy3-dCTP ersetzt.

Cy3 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der typischerweise mit Laserlicht der Wellenlänge 532 nm angeregt wird und bei ca. 570 nm ein Emissionsmaximum besitzt. Mit einem Fluoreszenz-Scanner, der mit entsprechendem Laser und einem Filter für Licht der Wellenlänge 550-600 nm ausgestattet ist, ist es somit möglich markiertes PCR-Produkt zu detektieren. Die Struktur des Cy3-dCTP sowie dessen Absorptions- und Emissionsspektren sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Strukturformel des Cy3-gekoppelten dCTPs (links); Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektrum (durchgezogen) von Cy3 (rechts)**

## Multiplex-PCR

In einer Multiplex-PCR lassen sich simultan mehrere verschiedene Produkte amplifizieren. Hierzu werden nicht nur ein Forward- und ein Reverse-Primer eingesetzt, sondern mehrere Primerpaare. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass nicht beliebig viele verschiedene Produkte simultan amplifiziert werden können. Abhängig von einer Vielzahl Faktoren, wie z.B. der jeweiligen Template- oder Primerkonzentration oder Wechselwirkungen unter Primern, kann die Produktausbeute bei einzelnen Amplifikaten erheblich geringer sein als bei anderen

[68]. Im Extremfall wird ein Teil der Targets in so geringem Maßstab amplifiziert, dass deren Menge unterhalb der Nachweisgrenze vieler Detektionsmethoden bleibt. In diesen Fällen ist eine aufwändige Optimierung der PCR-Bedingungen und gegebenenfalls eine Überarbeitung der eingesetzten Primer erforderlich.

Sofern im Einzelfall nicht anders angegeben wurden Multiplex-PCRs in dieser Arbeit nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

GC-Reaction Buffer	1x
dNTPs *	je 50 µM
Phusion Polymerase	20 mU/µl
Template DNA	1 ng/µl
Primer	je 0,1 µM

\* Im Fall einer Labeling-Multiplex-PCR wurde 40% des dCTPs in dem Ansatz durch Cy3-dCTP ersetzt

Die Zyklusbedingungen entsprachen denen der Standard-PCR.

### 3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die erfolgreiche Amplifikation von PCR-Produkten wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Hierfür wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 2,4% (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt. DNA Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und für 20-40 min unter 120V Spannung gesetzt. Nach dem Lauf wurden die Gele für 20-40 min entweder in ein Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml in TAE-Puffer) oder SYBR Gold-Bad (1x) gegeben. Mit Ethidiumbromid gefärbte Gele wurden unter Anregung durch UV-Licht fotografiert, während SYBR Gold gefärbte Gele mittels des *Fujifilm FLA5100* Fluoreszenz-Scanners bei einer Auflösung von 100 µm eingescannt wurden. Die Färbung mit SYBR Gold bietet im Vergleich zu Ethidiumbromid neben einer erhöhten Sensitivität auch den Vorteil, dass auch einzelsträngige DNA detektiert werden kann.

### 3.2.7 Lab-on-a-chip Elektrophorese

Eine weitere auf Elektrophorese basierende Technik zur DNA-Analyse stellt die Lab-on-a-chip Elektrophorese dar. Mittels des Bioanalyzer 2100 und unter Verwendung des DNA 1000 LabChip Kits konnte DNA ihrer Größe nach aufgetrennt und detektiert werden. Die Analysen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Sowohl die Auflösung als auch die Sensitivität des Systems liegt mit 5 Basen bzw. 0,1 ng DNA dabei deutlich über der der Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.2.8 Quantifizierung von DNA

DNA absorbiert Licht im ultravioletten Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Diese Tatsache macht man sich bei der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration zunutze. Die zu analysierende DNA-Lösung wird im Nanodrop mit einem Lichtstrahl durchleuchtet und absorbiert dabei einen Teil des eingestrahnten Lichts. Gemessen wird, welcher Anteil der eingestrahnten Quanten dazu in der Lage ist, die Lösung zu durchdringen. Dieser Wert ist abhängig von der DNA-Konzentration der Lösung, so dass sich aus den Messdaten auf diese schließen lässt. Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

$E_{\lambda}$  Extinktion der Probe

$\varepsilon_{\lambda}$  Extinktionskoeffizient; für DNA bei 260 nm: 0,02 µl/(ng\*cm)

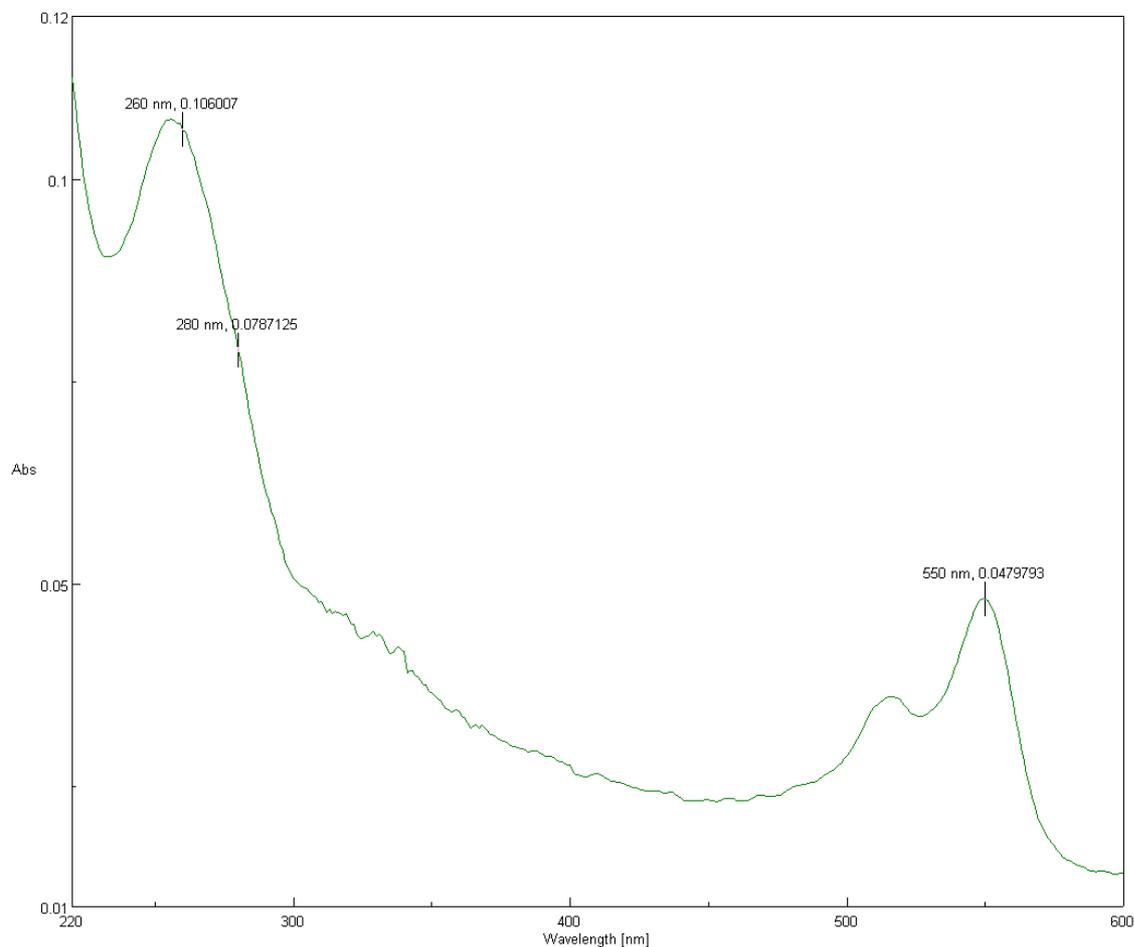
$c$  Konzentration [ng/µl]

$d$  Schichtdicke der Probe; hier: Küvettenbreite 1 mm

Um aufgereinigte Produkte einer Labeling-PCR zu quantifizieren, wird von diesen im Photometer ein Absorbtionsspektrum zwischen 220 und 600 nm aufgenommen. Als Referenz dient eine Probe von ddH<sub>2</sub>O, welche keine DNA enthält. Dies ermöglicht nicht nur die Ermittlung der DNA-Konzentration, sondern auch der Einbaurrate von Cy3 gekoppeltem dCTP in die PCR-Produkte. Der Farbstoff Cy3 hat ein Absorbtionsmaximum bei 550 nm. Eine starke Absorbtion von Licht dieser Wellenlänge indiziert somit einen starken Einbau markierter Nukleotide.

## Material &amp; Methoden

In Abbildung 3 ist das Absorptionsspektrum einer Cy3-markierten DNA-Probe nach ihrer Aufreinigung dargestellt.



**Abbildung 3: Absorptionsspektrum eines mit Cy3 markierten PCR-Produktes. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 550 nm lässt sich die Einbaurrate von Cy3-dCTP errechnen**

In dem Diagramm lassen sich die Extinktion bei 260 nm, 280 nm und 550 nm ablesen. Für die DNA-Konzentration ergibt sich bei einer Schichtdicke von 1 mm aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c_{DNA} = E_{260} \cdot 500 \cdot [ng / \mu l]$$

Mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht der vier Nukleotide von 330 g / mol lässt sich daraus auch die Menge der in der DNA enthaltenen Basen errechnen:

$$c_{DNA} = E_{260} \cdot 1493 \cdot [pmol / \mu l]$$

Material & Methoden

Die Bestimmung der Effizienz des Einbaus von markierten Nukleotiden in die synthetisierte DNA erfolgt über die Messung der Extinktion bei 550 nm. Mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von

$$\epsilon_{550} = 150000 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$$

ergibt sich für den Farbstoff eine molare Konzentration von

$$c_{\text{Cy3}} = E_{550} \cdot 67 \cdot [\text{pmol} / \mu\text{l}]$$

Setzt man diese, mit der molaren Konzentration aller Nukleotide ins Verhältnis, so ergibt sich die Einbaurate des Cy3 gekoppelten dCTP.

$$\text{Einbaurate}_{\text{Cy3}} = 0,0449 \cdot E_{550} / E_{260}$$

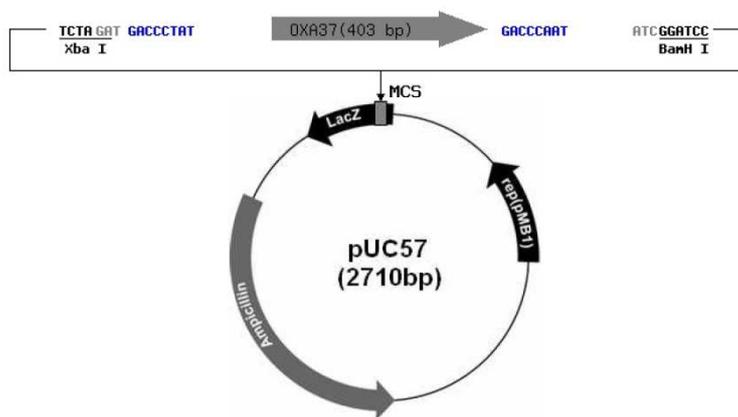
Die Extinktion bei 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Probe. Ist der Wert des Quotienten aus  $E_{260}/E_{280}$  geringer als 1,6, so deutet dies auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen hin.

### 3.2.9 Erzeugung kompetenter Zellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden mittels der Rubidium-Chlorid-Methode kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  Zellen erzeugt. Hierfür wurde der Stamm in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,7 angezogen, für 15 min auf Eis gekühlt und bei 3000 g und 4°C in 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml TFBII-Lösung resuspendiert, erneut 15 min auf Eis inkubiert und bei 3000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml TFBII-Lösung resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.10 Transformation kompetenter Zellen

In allen Transformationsexperimenten wurde das Plasmid pUC57 mit verschiedenen Insertionen in einer *Multiple-Cloning-Site* (MCS) innerhalb des Gens lacZ (s. Abbildung 4) eingesetzt.



**Abbildung 4: Plasmidkarte des Plasmids pUC57. Das hier gezeigte Plasmid hat einen 403 bp langen Abschnitt des Gens *bla<sub>OXA-37</sub>* in seine MCS integriert**

Für die Transformation wurden 100 ng Plasmid-DNA zu 50 µl dispergierten kompetenten *E.coli* DH5α Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Nach 2 minütiger Inkubation auf Eis wurden 950 µl LB-Medium zugegeben und für weitere 90 min bei 37°C inkubiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf mit Ampicillin versetztem LB-Agar.

### 3.2.11 Sequenzierung

Alle Sequenzierungsläufe basierten auf der von Sanger entwickelten Technik [69]. Ausgeführt wurden diese mittels des ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* gemäß den Angaben des Herstellers. Für die in dem Protokoll enthaltene Sequenzierungs-PCR wurden die gleichen Primer eingesetzt, die zur Generierung des zu sequenzierenden PCR-Produkts verwendet wurden.

Sequenzierungs-PCR:

PCR-Produkt (aufgereinigt)	0,5 µg
Primer	3,2 pmol
<i>Ready-Reaction-Mix</i>	8 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Ready-Mix enthielt neben dNTPs, Salzen und Polymerase auch markierte ddNTPs, die zum Abbruch der Elongation des Produktes führen. Die Amplifikation der Sequenzierungs-PCR-Produkte erfolgte in 25 Zyklen:

Denaturierung	96°C	15 s
Annealing	55°C	15 s
Elongation	60°C	4 min

Nach Abschluss der Reaktion wurden den Ansätzen 120 µl H<sub>2</sub>O zugefügt und die Produkte mit 15 µl von 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 375 µl Ethanol ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 13.000 g für 20 min wurde das Pellet zweimal mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Resuspension des Pellets in 20 µl H<sub>2</sub>O konnte die Probe mittels des *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* sequenziert werden.

### 3.2.12 Auswahl von Zielgenen

Das Einsatzgebiet eines Microarrays wird festgelegt durch die Targets, die dieser detektieren kann. Entsprechend ist die Auswahl relevanter Targets für eine spezifische Anwendung von zentraler Bedeutung. Gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit sollten Gene, welche das Resistenzverhalten von *Acinetobacter baumannii* gegenüber Antibiotika beeinflussen können, möglichst umfassend nachgewiesen werden. Die Auswahl relevanter Gene erfolgte primär über Internet- und Literaturrecherche.

### 3.2.13 Datenbankaufbau

Um einen Resistenzfaktor mittels Microarrays detektieren zu können, muss dieser in einer PCR amplifiziert und markiert werden. Grundvoraussetzung hierfür ist die Kenntnis seiner genauen Sequenz. Von beinahe allen Resistenzfaktoren existiert jedoch nicht nur eine definierte Sequenz, sondern eine Reihe von Subtypen, die sich in ihrer Basenfolge teils erheblich unterscheiden können. Sollen alle bzw. möglichst viele dieser Subtypen von dem Array erfasst werden, so ist es erforderlich entweder für jeden Subtyp separate Primer und Sonden zu entwickeln oder Bereiche mit hoher Sequenzhomologie zu identifizieren, innerhalb derer ein Primer- und Sondendesign für alle Subtypen möglich ist.

Um homologe Bereiche für das Primer- und Sondendesign zu ermitteln wurden die Sequenzdaten aller Targets, inklusive aller verfügbaren Subtypen, von der öffentlichen Sequenzdatenbank *Genbank* geladen. Mittels der Software *Geneious*

*Pro 5.3.6* wurde ein multiples Sequenzalignment jeweils aller Subtypen eines Resistenzfaktors durchgeführt.

### 3.2.14 Primerdesign

Alle Primer wurden auf Basis der Sequenzalignments dahingehend entwickelt, dass sie in konservierten Bereichen ihres Targets lagen und somit alle bzw. möglichst viele Subtypen amplifizieren konnten. Die Vorgabe für die *in silico* berechnete Schmelztemperatur der Primer lag bei 57°C, für die Länge bei 18-30 Basen und für den GC-Gehalt bei 50%. Die Base am 3'-Ende des Primers sollte Guanin oder Cytosin sein. Als sekundäre Parameter wurde auch die freie Enthalpie für die Bildung intramolekularer Haarnadelstrukturen oder Dimere berechnet. Hierfür und auch für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde der *Oligoanalyzer* von *Integrated DNA Technologies* eingesetzt.

### 3.2.15 Sondendesign

Die Auswahl der Sonden bestimmt die Funktionalität und Qualität eines Microarrays. Um Sonden mit maximaler Sensitivität und Spezifität zu entwickeln, müssen eine Vielzahl an Faktoren berücksichtigt werden. Wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität der Sonde nimmt die Schmelztemperatur, Länge, Position ihrer Bindestelle innerhalb ihres Targets, der GC-Gehalt und, in geringerem Maße, auch deren Hang zur Ausbildung von Homodimeren oder Haarnadelstrukturen. Die Spezifität dagegen wird primär durch ihre genaue Basenfolge definiert. Für manche Anwendungen, wie z.B. die Detektion von Punktmutationen, muss eine Sonde ihr spezifisches Target von DNA mit sehr ähnlicher Sequenz abgrenzen. In diesen Fällen muss die Sonde so positioniert werden, dass die diskrepanten Basen in ihrer Mitte lokalisiert sind. An dieser Position reduzieren die nicht komplementären Basen die Affinität der Sonde zum falschen Target maximal, was in einer höheren Spezifität der Sonde resultiert [70].

Die Software *Geneious Pro* bzw. der *Oligo Analyzer* wurden genutzt um anhand der erstellten Sequenzalignments für jedes Target *in silico* 1-3 spezifische Sonden zu erstellen. Die Vorgabe für die Schmelztemperatur, Länge und GC-Gehalt lag bei 58°C, 18-30 Basen bzw. 50%. Die Enthalpie der Dimerbildung oder Ausbildung von Haarnadelstrukturen sollte möglichst groß sein. Um die Wahrscheinlichkeit einer

Kreuzreaktivität der Sonden zu reduzieren wurden potentiell nicht-spezifische Hybridisierungspartner *in silico* mittels des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ermittelt. Ob die entwickelten Sonden unter realen Bedingungen eine hinreichende Sensitivität und Spezifität erreichten, musste für jede Sonde im Einzelnen experimentell eruiert werden. Um die Effizienz der Sondenimmobilisierung auf dem Microarray bzw. der Hybridisierungsreaktion zu erhöhen, wurden alle Sonden am 5' Ende sowohl mit einem Abstandhalter, bestehend aus 14 Tyrosinbasen sowie einer Amino-Modifikation versehen. Die Sonden wurden von *Metabion International AG* hergestellt und in lyophilisierter Form ausgeliefert. Die Sonden wurden in Wasser gelöst, auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingestellt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.16 Herstellung von Microarrays

Die Sonden wurden mittels eines *BioRobotics MicroGrid II* Spottingroboters unter Verwendung von *SMP3 Split-Pins* auf *Schott Nexterion Slide E* Träger gedruckt. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  Sondenlösung mit der gleichen Menge Spottingpuffer vermischt und in 384-well Platten überführt. Der verwendete Spottingpuffer bestand zu gleichen Teilen aus den beiden Komponenten *Schott Nexterion Spot I* und *Spot III*. Der Spottingroboter nahm mittels der *SMP3 Split-Pins* Sondenlösung in der 384-well Platte auf und brachte jede Sonde an vorher genau definierter Position auf den Träger auf. Dabei entstanden Sonden-Spots mit ca. 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Die Oberfläche des *Nexterion Slide E* Trägers war funktionalisiert mit Epoxidgruppen, so dass die aminomodifizierten Sonden kovalent darauf immobilisiert werden konnten.



Abbildung 5: BioRobotics MicroGrid II Spottingroboter (links); Pintool mit 8 Pins während dem Druckprozess

Frisch bedruckte Arrays wurden für 2h bei 120°C gebacken und anschließend unter Argonatmosphäre gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Microarrays nach Angaben des Slide-Herstellers geblockt durch Inkubation in den folgenden Lösungen:

Rinse I	5 min bei 22°C
Rinse II	4 min bei 22°C
Rinse III	10 min bei 22°C
ddH <sub>2</sub> O	1 min bei 22°C
Nexterion Blocking Solution	10 min bei 50 °C
ddH <sub>2</sub> O	1 min bei 22°C

### 3.2.17 Hybridisierung

Für jede Hybridisierung musste zum einen ein Microarray geblockt werden, zum anderen 45 µl Hybridisierungsmix vorbereitet werden. Dieser enthielt neben der Proben-DNA in Form von 30 µl PCR-Produkt, SDS (0,1%) und SSC-Puffer (4x) auch eine Positivkontrolle (20 nM). Dabei handelte es sich um ein Cy3-markiertes Oligonukleotid, das revers-komplementär zu einer Sonde des Arrays war. Diese Sonde lieferte somit immer ein Signal, sofern die Hybridisierungsreaktion nicht inhibiert war und fungierte so als Hybridisierungskontrolle. 45 µl des Hybridisierungsmixes wurden zwischen die bedruckte Fläche des Microarrays und ein aufgelegtes *Lifterslip* pipettiert und die Hybridisierungsreaktion somit gestartet. Die Arrays wurden sofort in eine Tauchkammer gelegt, diese luftdicht verschlossen und für 1h in einem Wasserbad mit 58°C inkubiert.

Die Hybridisierungstemperatur wie auch der Salzgehalt des Hybridisierungsmixes regulieren die Stringenz der Reaktion. Eine zu hohe Temperatur oder zu niedriger Salzgehalt verhindert eine effiziente Hybridisierung, während bei zu niedriger Temperatur bzw. zu hohem Salzgehalt vermehrt unspezifische Hybridisierung stattfinden kann. Die gewählten Bedingungen haben sich im Laufe dieser Arbeit als optimal herausgestellt, um hinreichend hohe spezifische Signale auf allen Sonden zu erzeugen, ohne in größerem Umfang Kreuzhybridisierungen zuzulassen. Die Hybridisierungsreaktion wurde gestoppt, indem die Arrays für je 10 min in den

Waschlösungen I-III geschwenkt wurden. Nach einem Trocknungsschritt in der Zentrifuge für 1 min bei 1000 rpm wurden sie der Scanneranalyse zugeführt.

### 3.2.18 Microarray Signaldetektion

Die an Sonden gebundene Proben-DNA wurde mittels eines Axon GenePix 4300A Microarray-Scanners detektiert. Dieser regte das in der Proben-DNA integrierte Cy3 mit einem 532 nm Laser an und quantifizierte das emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 550-600 nm. Die Auslesung des Arrays erfolgte dabei mit einer Auflösung von 10 µm und einer Signalverstärkung durch den integrierten Photomultiplier von 400 PMT. Die vom Scanner erzeugten Bilddaten wurden mit Hilfe der *GenePix Pro 7.0.2* Software analysiert. Die Software identifizierte anhand der Position jedes Sondenspots um welche Sonde es sich handelte und berechnete dessen Signalintensität abzüglich des lokalen Hintergrundsignals.

### 3.2.19 Dateninterpretation

Der positive Nachweis einer Resistenzdeterminante galt als gegeben wenn mindestens eine Sonde, die für diese spezifisch ist, eine Signalstärke von 1000 *counts* nach Hintergrundkorrektur aufwies. Dabei handelte es sich um einen empirisch entwickelten Schwellenwert, der sich als geeignet erwies, um negative und positive Signale voneinander zu unterscheiden.

Die Detektion von resistenz-relevanten Punktmutationen basierte darauf, dass eine Sonde der Sequenz des Wildtyps, eine Weitere der Sequenz der Mutante entsprach. Handelte es sich um eine einzelne Punktmutation, so unterschieden sich die beiden Sonden entsprechend nur in einer Base. Je nachdem, ob DNA des Wildtyps oder der Mutante auf dem Array hybridisiert wurde, lieferte die Sonde, deren Sequenz keine Basenfehlpaarung (*Mismatch*; MM) zur Sequenz dieser DNA aufwies, ein stärkeres Signal als die andere. Ein Vergleich der beiden Sondensignale gab folglich Aufschluss darüber, welcher Genotyp vorlag. Ein hinreichend eindeutiges Ergebnis wurde dann angenommen, wenn die Signalstärke der MM-Sonde 70% der Signalstärke der vollständig komplementären Sonde (*Perfect-match*; PM) nicht überstieg [71]. Waren beide Signale in ihrer Intensität vergleichbar, so ließ sich zwar

eine Tendenz zum einen oder anderen Fall ablesen, jedoch kein gesichertes Ergebnis.

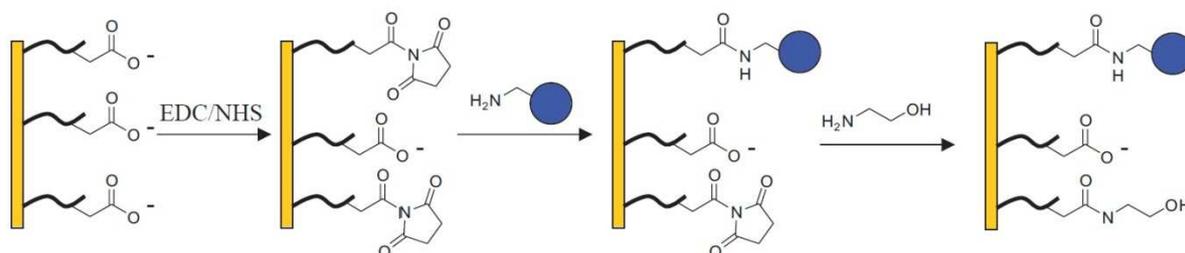
### 3.2.20 Statistische Auswertung

Als Qualitätskriterien für Microarrays nach der experimentellen Validierung haben sich die Parameter Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (*positive predictive value*; PPV) und negativer Vorhersagewert (*negative predictive value*; NPV) durchgesetzt. Zu deren Berechnung wurden vier Werte ermittelt: die Anzahl echt-positiver, echt-negativer, sowie falsch-positiver und falsch-negativer Fälle. Ein echt-positiver Nachweis (EP) eines Targets lag vor, wenn dieses vorhanden war und korrekt detektiert wurde. Wurde es dagegen nicht detektiert, handelte es sich um ein falsch-negatives Ergebnis (FN). Entsprechend lag ein echt negativer Nachweis (EN) vor, wenn ein Target nicht vorhanden war und auch negativ detektiert wurde, wohingegen der positive Nachweis eines nicht vorhandenen Targets ein falsch-positives Resultat (FP) darstellte. Die Sensitivität berechnete sich nach der Formel  $EP/(EP+FN)$  und gab an, in wie viel Prozent der Fälle ein vorliegendes Target korrekt detektiert wurde. Die Spezifität dagegen gab wieder, wie häufig ein fehlendes Target tatsächlich auch negativ detektiert wurde. Die Berechnung erfolgte durch  $EN/(EN+FP)$ . Der Positiv-prädikative-Wert gab an, wie oft ein durch den Array detektiertes Target tatsächlich vorhanden war, während der Negativ-prädikative-Wert aussagte, wie oft ein negatives Arrayresultat der Realität entsprach. Die Berechnung dieser Werte erfolgte nach den Formeln  $PPV=EP/(EP+FP)$  bzw.  $NPV=EN/(EN+FN)$ .

### 3.2.21 Oberflächenplasmonenresonanzspektrometrie

Mittels der Oberflächenplasmonenresonanzspektrometrie (SPR) kann die Anlagerung von Molekülen in Flüssigphase an eine Oberfläche sehr empfindlich quantifiziert werden. Diese Anlagerung ist abhängig von der Interaktion der gelösten Moleküle mit funktionellen Gruppen, die auf der Oberfläche immobilisiert sind. In dieser Arbeit wurden in verschiedenen Experimenten unterschiedliche Sonden auf die Analysenoberfläche gebunden und deren Hybridisierungsgeschwindigkeit mit gelöster DNA ermittelt.

Alle SPR-Messungen wurden mittels des *BiocoreT200* unter Verwendung von *Series S Sensor Chip CM5* durchgeführt. Die Analysenoberfläche befand sich innerhalb einer Fließzelle des *CM5* Chips und war mit carboxylierten Dextranstrukturen beschichtet. Um die Sonden kovalent an die Oberfläche zu binden, mussten die Carboxylgruppen zunächst durch Überspülen mit 70  $\mu\text{l}$  von 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS), 200 mM *N*-Ethyl-*N*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) aktiviert werden. Die Sondenbindung erfolgte dann durch Überspülen mit 35  $\mu\text{l}$  von 5  $\mu\text{M}$  amino-modifizierter Sonde in 10 mM HEPES Puffer (pH 7.4) mit 0,6 mM Cetyltrimethylammoniumbromid. Verbliebene aktivierte Carboxylgruppen wurden mittels 70  $\mu\text{l}$  1 M Ethanolamin-hydrochlorid (pH 8,5) deaktiviert.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immobilisierungs-Reaktion von amino-modifizierten Sonden (blauer Kreis) an die Festphasen-gebundenen carboxylierten Dextranstrukturen. In einem ersten Schritt werden die Carboxylgruppen mit EDC und NHS aktiviert, dann findet die Bindung der Sonden statt und abschließend werden verbliebene aktivierte Gruppen durch Ethanolamin-hydrochlorid inaktiviert (GE Healthcare Technology Note 21)**

Die Hybridisierungsreaktion wurde gestartet durch Injektion des Hybridisierungsmixes (vgl. Abschnitt 3.2.17). Der Verlauf der Hybridisierungsreaktion wurde durch die Zunahme der *Response Units* (RU) im Zeitraum zwischen 300s und 1400s nach Probeninjektion bei 45°C dokumentiert. Nach der Messung wurde nicht-kovalent an den Chip gebundene DNA durch Spülen mit 300  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O entfernt und der Chip somit für weitere Messungen regeneriert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Identifikation Resistenz-relevanter Targets

Die Identifizierung von genetischen Faktoren, welche die Resistenz von *Acinetobacter baumannii* gegenüber Antibiotika beeinflussen, war der erste Schritt der Microarrayentwicklung. Hierzu wurde die Literaturdatenbank *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) auf relevante Publikationen hin durchsucht. Auf Basis dieser Daten wurde eine Liste mit in *Acinetobacter baumannii* vorkommenden Resistenzgenen, relevanten Punktmutationen und Insertionselementen, welche die Resistenz beeinflussen können, erstellt und im Verlauf dieser Arbeit mehrfach aufgrund neuer Publikationen aktualisiert. Als relevante Faktoren wurden ermittelt:

- $\beta$ -Lactamasen

*bla<sub>OXA-20-like</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-40-like</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, *bla<sub>OXA-51-like</sub>*, *bla<sub>OXA-58-like</sub>* [47], *bla<sub>KPC</sub>* [72], *bla<sub>VIM</sub>* [73], *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>* [74], *bla<sub>SIM</sub>* [75], *bla<sub>PSE</sub>* [76], *bla<sub>VEB</sub>* [77], *bla<sub>PER</sub>* [78], *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* [76], *bla<sub>GIM</sub>* [79], *bla<sub>SPM</sub>* [80], *bla<sub>GES</sub>* [81], *bla<sub>NDM</sub>* [82], *bla<sub>ADC</sub>* [83], *bla<sub>RTG</sub>* [84], *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* [85], *bla<sub>DHA</sub>* [86]

- Aminoglykosid modifizierende Enzyme

*aph(3')-I*, *aph(3')-II*, *aph(3')-III*, *aph(3')-VI*, *aac(6')-I*, *aac(3)-Ia*, *aac(3)-II*, *aac(3)-IV*, *ant(2'')-I*, *ant(3'')-I* [87, 88]

- Effluxsysteme

*abeM*, *qacE*, *abeB*, *abeR*, *adeS*, *cmla*, *tetA*, *tetB* [89], *tetG*, *tetM*, *floR* [90], *craA* [91], *tetH*, *tet(39)* [92]

- Punktmutationen

*parC-S80F*, *-S80L*, *-E84K*, *gyrA-S83L*, *-E87G* [52], *bla<sub>ADC</sub>-R148Q* [93], *-V208A* *-N283S* [83], *-P210R*, *-A215AA* [94]

- Insertionselemente

*ISAb<sub>a1</sub>*, *IS1133* und deren Integrationsort *upstream* von *bla<sub>OXA-51</sub>* [95], *bla<sub>OXA-23</sub>* [96], *bla<sub>OXA-58</sub>* [97], *bla<sub>ADC</sub>* [98, 99] und in *adeS*

- Andere

## Ergebnisse

*armA* [100], *sul1*, *sul2* [101], *arr-2* [102], *catB*, *catI* [103], *strA*, *strB* [104], *dfrA7* [105], *dfrA1*, *dfrA10* [106], *dfrA12* [107], *qnrA* [108], *qnrB* [109]

Die Detektion einiger relevanter Resistenzfaktoren konnte mit der in dieser Arbeit eingesetzten Microarraytechnik nicht realisiert werden:

- Deletion des Gens *carO*

Der Verlust des Membranproteins *CarO* verringert die Permeabilität der äußeren Plasmamembran. Dies erschwert das Eindringen verschiedener Antibiotika in die Zelle und erhöht somit deren Resistenz. Die Deletion wird verursacht durch die Integration eines Insertionselementes in das *carO* Gen. Da hierfür allerdings verschiedene Insertionselemente verantwortlich sein können und auch die exakte Integrationsstelle innerhalb des *carO* Gens variabel ist [98], ist ein Nachweis mittels Microarray äußerst aufwendig.

- Veränderung des Expressionsmusters verschiedener Penicillin-binde-Proteine (PBP)

Bakterien verfügen über verschiedene PBPs mit unterschiedlichen Affinitäten zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Durch erhöhte Expression niedrig affiner Enzyme verringert sich die Sensitivität gegenüber dieser Antibiotikaklasse. Die Analyse veränderter Expressionsmuster wurde nicht in Betracht gezogen, da hierfür sowohl Probenvorbereitung als auch Array-Aufbau unterschiedlich sind.

- Colistin-Resistenz auslösende Punktmutationen

Die Colistin-Resistenz wird durch den Verlust von LPS auf der bakteriellen äußeren Membran vermittelt. Dies kann durch den Ausfall eines beliebigen Schrittes innerhalb des Syntheseweges ausgelöst werden. Beschrieben sind verschiedene Punktmutationen und die Integration von Insertionselementen in die Gene *lpxA*, *lpxC* und *lpxD*. Die Existenz einer Vielzahl weiterer, bislang nicht beschriebener Mutationen ist allerdings sehr Wahrscheinlich [110, 111]. Die Vielfalt der möglichen, teils nicht charakterisierten Mutationen erlaubt keine zuverlässige Microarray-basierte Detektion der Colistin-Resistenz.

## 4.2 Datenbankaufbau

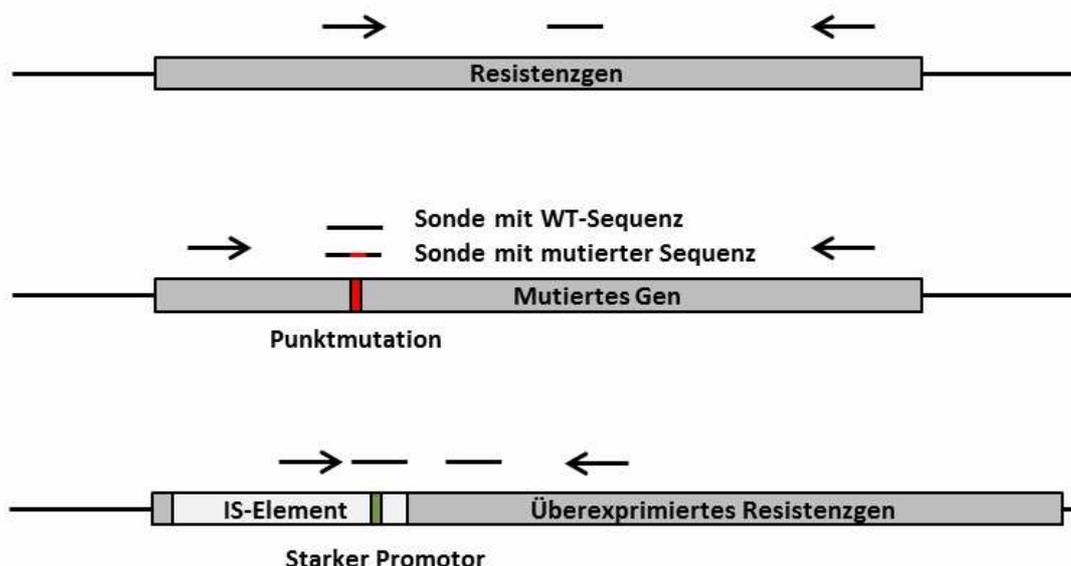
Insgesamt 762 Sequenzen aller Resistenzfaktoren, einschließlich aller in *A. baumannii* vorkommender Subtypen, wurden von der öffentlichen Datenbank *Genbank* geladen. Sequenzen verschiedener Subtypen des gleichen Targets wurden

Ergebnisse

mittels der Software *Geneious Pro 5.3.6* jeweils miteinander verglichen und die resultierenden 143 Sequenzalignments zur Erstellung Target-spezifischer Primer und Sonden genutzt.

### 4.3 Detektionsstrategien

Der zu entwickelnde Microarray sollte dazu in der Lage sein, drei mechanistisch unterschiedliche Ursachen der Resistenzausbildung zu detektieren: der Erwerb eines Resistenzgens, die Integration eines mobilen genetischen Elements an einer resistenz-relevanten Position im Genom und die Punktmutation eines chromosomal kodierten Gens. Alle drei Fälle benötigen zu deren Detektion eine unterschiedliche Anzahl oder Positionierung der Primer und Sonden.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei mechanistisch unterschiedlichen Detektionsprinzipien: Nachweis eines Resistenzgens, Nachweis einer Punktmutation und Nachweis der Integrationsstelle eines mobilen genetischen Elements. Markiert ist die Position der dafür jeweils nötigen Primer (schwarze Pfeile) und Sonden (schwarze Balken)**

#### Erwerb eines Resistenzgens

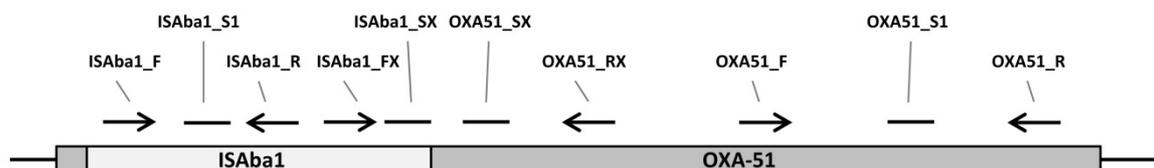
Die Detektion eines erworbenen Resistenzgens war vergleichsweise einfach zu realisieren. Ein Abschnitt des Gens wurde mittels zweier für das jeweilige Gen spezifischer Primer amplifiziert und durch eine Sonde, die innerhalb des amplifizierten Bereichs lag, detektiert. Ein positives Signal auf der Sonde galt als erfolgreicher Nachweis des Resistenzgens.

Ergebnisse

### Integration eines mobilen genetischen Elements

Der Einfluss, den die Integration eines mobilen genetischen Elements auf das Resistenzverhalten eines Stammes hat, ist abhängig davon, an welcher Position innerhalb des Genoms das Element integriert. Der alleinige Nachweis eines solchen Elements ist somit nicht genügend, um seine Auswirkung auf den Resistenzphänotyp zu bestimmen.

Die Detektion der Integrationsstellen der Elemente *ISAbal* und *IS1133* wurde realisiert, indem jeweils ein Forward-Primer und eine Sonde am 3' Ende der Elemente entwickelt wurde sowie eine Reihe von Reverse-Primern und Sonden im 5' Bereich der potentiellen Integrationsstellen *upstream* der Gene *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *adeS* und *bla<sub>ADC</sub>*. Kombinatorisch ließ sich auf Basis der resultierenden Arraysignale ermitteln welches mobile Element *upstream* von welcher Integrationsstelle positioniert war. So indizierte zum Beispiel ein positives Signal auf den beiden Sonden *ISAbal\_SX* und *OXA51\_SX*, die das Übergangsprodukt von *ISAbal* und *bla<sub>OXA-51</sub>* detektieren (vgl. Abbildung 8), die Integration des Insertionselements *upstream* des Resistenzgens. Der Nachweis von *ISAbal* über die Sonde *ISAbal\_S1* und des Gens *bla<sub>OXA-51</sub>* über die Sonde *OXA51\_S1* diene als zusätzliche Kontrolle, dass beide Targets tatsächlich präsent waren.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Integrationsstelle des mobilen Elements *ISAbal* *upstream* des Gens *bla<sub>OXA-51</sub>* einschließlich der Primer (Pfeile) und Sonden (Balken), die zu deren Nachweis notwendig sind

### Punktmutation eines chromosomal kodierten Gens

Die insgesamt 10 resistenz-relevanten Punktmutationen in den Genen *bla<sub>ADC</sub>*, *gyrA* und *parC* wurden jeweils durch ein Sondenpaar detektiert. Von diesen entsprach eine Sonde in ihrer Sequenz dem Wildtyp, die andere dagegen der Mutante. Je nachdem, ob in die Hybridisierung DNA des Wildtyps oder der Mutante eingesetzt wurde, generierte somit die Sonde, welche perfekt zur Sequenz der Probe passte, ein stärkeres Signal als die Sonde, welche einen *Mismatch* enthielt. Anhand des Verhältnisses dieser beiden Sonden ließ sich somit der Genotyp der Probe ermitteln.

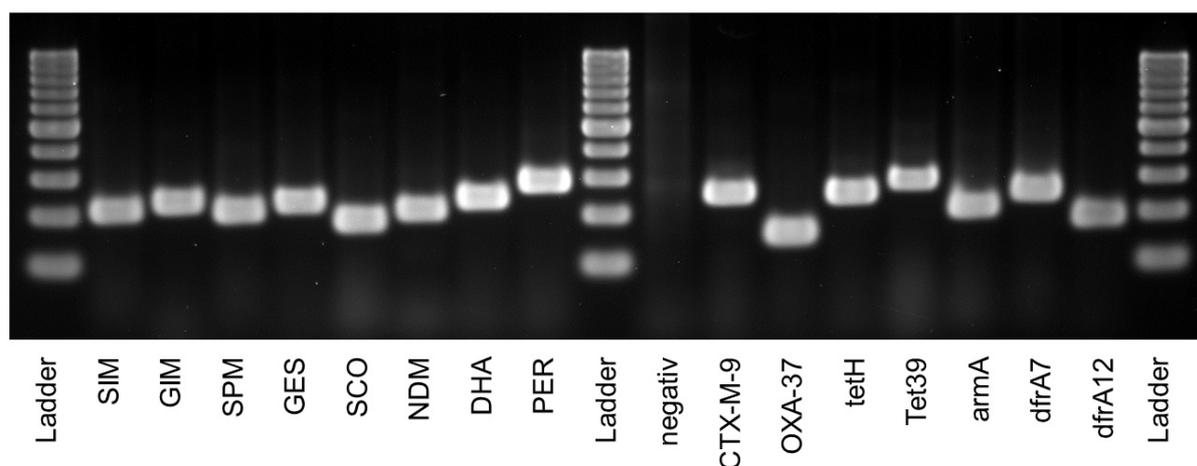
Ergebnisse

#### 4.4 Primerdesign

Auf Basis der multiplen Sequenzalignments wurden 216 Primer entwickelt, von denen 168 im finalen Protokoll zur Anwendung kamen. Eine Liste dieser Primer findet sich im Anhang in Tabelle 16.

#### 4.5 Primertestung mit Positivkontrollen

Alle entwickelten Primer wurden auf ihre Funktionalität hin untersucht. Hierfür wurde jedes Primerpaar mit seinem spezifischen Target als Template in eine Singleplex-PCR eingesetzt und das Produkt im Agarosegel nachgewiesen und sequenziert. Bei 168 Primern wurde das spezifische Produkt erfolgreich amplifiziert. 48 Primer wurden wegen ausbleibender Amplifikation oder signifikanter Bildung unspezifischer Nebenprodukte verworfen und neu entwickelt. In Abbildung 9 sind exemplarisch die Produkte von 15 Ansätzen im Agarosegel zu sehen.



**Abbildung 9:** Agarosegel mit 15 erfolgreich amplifizierten Targets. Alle Produkte weisen die erwartete Größe auf (vgl. Tabelle 16). Ebenfalls aufgetragen sind eine Negativkontrolle („negativ“) und drei Ladder (GeneRuler 1kb)

Die Templates, die in der PCR als Positivkontrollen dienten, waren verschiedenen Ursprungs. Zum einen wurden in der Literatur beschriebene Referenzstämme eingesetzt, zum anderen wurden klinische Isolate verwendet, die in einem vorangegangenen Screening positiv auf das jeweilige Target getestet worden waren. Da es sich hierbei jeweils um Templates aus nativen Quellen handelte, werden diese im Folgenden als native Positivkontrollen bezeichnet. Diese waren für insgesamt 59 Targets verfügbar. Im Fall von Targets, für die keine native Positivkontrolle verfügbar war, wurde die entsprechende Zielsequenz eingebettet in das Plasmid pUC57 von

Ergebnisse

der Firma *GeneScript* synthetisiert. Die Plasmide wurden je in einen *E. coli* Stamm transformiert und dieser als Positivkontrolle für das jeweilige Target genutzt. Diese Stämme werden im Folgenden als synthetische Positivkontrollen bezeichnet. Mit Hilfe der synthetischen Positivkontrollen konnten 32 weitere Targets amplifiziert werden.

#### **4.6 Sondendesign**

Anhand der multiplen Sequenzalignments wurden neben den Primern auch 370 Sonden erstellt, von denen 324 in der finalen Version des Microarrays zur Anwendung kamen. 238 dieser Sonden dienten dem Nachweis eines Resistenzgenes, 68 der Detektion einer Resistenz-relevanten Punktmutation und 18 der Erkennung von Veränderungen im Promotor eines Resistenzgens. Die detektierbaren Promotormutationen führen zur Überexpression des zugehörigen Resistenzgens. Alle verwendeten Sonden sind im Anhang in Tabelle 17 aufgelistet.

#### **4.7 Microarrayherstellung**

Die entwickelten Sonden wurden zusammen mit einer Spottingkontrolle und einer Hybridisierungskontrolle gemäß dem in Abschnitt 3.2.16 beschriebenen Protokoll mit zwei SMP3-pins auf Microarrayrohlinge gedruckt. Bei der Spottingkontrolle handelte es sich um ein Cy3 markiertes Oligonukleotid, das auf dem Array unabhängig vom Ablauf der Hybridisierungsreaktion immer ein positives Signal generierte. Die Hybridisierungskontrolle war eine Sonde, deren Sequenz revers-komplementär zur Cy3-markierten Positivkontrolle war, welche dem Hybridisierungsmix beigefügt wurde. Das verwendete Spottingschema ist in Abbildung 10 dargestellt.

## Ergebnisse

SpotK	HybK		HybK	SpotK	HybK		HybK	SpotK
	dhfr1 S4	tetA S1	ampC S1		armA S1	OXA23 S1	ANT2la S1	
SpotK	dhfr1 S2	tetB S1	ampC S 208V		abeM S1	OXA23 S2	ANT3la S1	
	dhfr1 S	tetG S1	ampC S 208A		sul1 S1	OXA23 SX	ANT3la S2	
	dhfr1 S5	tetH S1	ampC S 283N		sul2 S1	OXA24 S1	ANT3_9_S1	
	dhfr1 S3	tetL S1	ampC S 283S		Mdfr S1	OXA24 SX	APH1 S1	
HybK	dhfr1 S6	tetM S2	ampC S 210P	HybK	arr S1	OXA37 S1	APH2 S1	HybK
	dhfr1 S7	tetM S3	ampC S 210R		cmIA1 S1	OXA48 S1	APH2 S2	
	dhfr7 S	tetA39 S1	ampC S 215		qnrB1 S1	OXA51 S1	APH3 S1	
	dhfr7 S2	tetA S2	ampC S 215A		qnrB S2	OXA51 SX	APH6 S1	
	dhfr10 S1	tetA S3	ampC S 148R		qnrA1_8_S1	OXA58 S1	AAC(3)II S2	
	dhfr12 S	qacE S2	ampC S 148Q		strA S1	OXA58 SX	aac6IL S2	
	floR S1	qacE S4	ampC S 148 WT		strB S1	ampC SX	aac6IL S3	
SpotK	HybK	adeS_SRX	adeS_SFX	HybK	SpotK	HybK	HybK	SpotK
SpotK	HybK			HybK	SpotK	HybK	HybK	SpotK
	Parc S AB 251C T	IS1133 SX	GIM S1		VEB S1	AAC6I_J S1	IMP1 S1	
SpotK	Parc S AB 251C	IS1133 S1	SPM S1		PER1 S1	AAC6I_rw S1	IMP2 S1	
	Parc S AG 251T	ISabaSX	CTXM S1		PER2 S1	AAC6IL S1	IMP2 S2	
	Parc S AG 251T T	ISaba1 S3	CTXM1 S2		TEM S1	AAC3la S2	VIM S	
	ParC S AB 262A	AAC3II S2	CTXM1 S1		SHV S1	AAC3la S3	catB3 S	
HybK	ParC S AB 262G	intl S3	CTXM2 S1	HybK	CARB-5 S1	AAC6Ib S1	catI S	HybK
	ParC S AG 262A	GyrA S 242T	CTXM9 S1		GES S1	AAC6Iad S1	catB3_8 S	
	ParC S AG 262G	GyrA S 242C	PSE S1		NDM S1	AAC6Ih_S1(alt)	AADA2 S1	
	adeS S 153Thr	GyrA S 242C 254A	PSE S3a		SCO S1	AAC6Ih S1	AADA4_5 S	
	adeS S 153Met	GyrA S 242T 254A	PSE S3b		SHV S2	AAC6I_stuv S1	AAC3IV S1	
	adeR S 116Leu	GyrA S 242C 254G	DHA S1		SIM S1	AAC6Ilg_S1	KPC S	
	adeR S 116Pro	GyrA S 242T 254G	TEM S2		CARB4 S1	AAC6Ik S1	adeB S1	
SpotK	HybK	parC_S AB 251 TTT		HybK	SpotK	HybK	HybK	SpotK

Abbildung 10: Spottingschema des Microarrays. Jede Sonde wird in Sense- und Antisense-Konfiguration und jeweils in Duplikaten gespottet. Diese vier Sondenspots liegen jeweils horizontal nebeneinander und sind zusammengefasst in Form grauer Zellen mit der jeweiligen Sondenbezeichnung dargestellt. Grüne Zellen repräsentieren einzelne Spots der Spottingkontrolle (SpotK) und der Hybridisierungskontrolle (HybK)

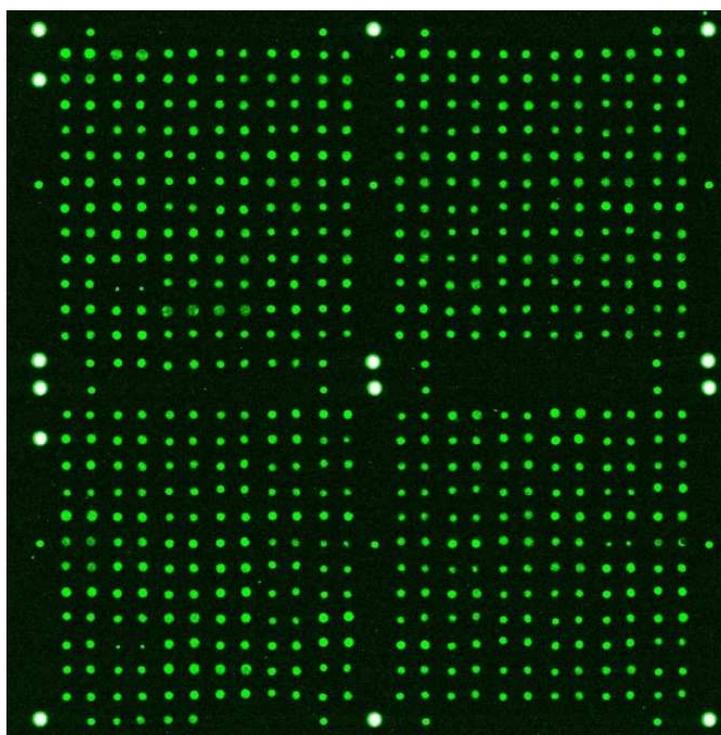


Abbildung 11: Aufnahme eines frisch gedruckten Arrays. Der Array wurde mittels des Axon GenePix 4300A Scanners unter erheblicher Signalverstärkung (PMT 750) eingescannt. Bei dieser Verstärkung werden die Salzkristalle des Spottingpuffers sichtbar, so dass jeder Sondenspot, unabhängig von seiner Basensequenz, ein detektierbares Signal generiert. Die Cy3 enthaltenden Spottingkontrollen lieferten unter diesen Bedingungen einen extrem hohen Intensitätswert

Ergebnisse

#### 4.8 Sondenvalidierung

Alle Sonden wurden auf ihre Sensitivität und Spezifität hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde jedes Target in einer Labeling-Singleplex-PCR amplifiziert, das Produkt mittels des *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt und 300 ng DNA auf dem Microarray hybridisiert. Eine Sonde wurde als sensitiv bewertet, wenn sie bei der Hybridisierung mit ihrem spezifischen Target ein Signal von über 10.000 *counts* erbrachte. Erbrachte sie weiterhin bei der Hybridisierung mit allen anderen Targets kein Signal über 500 *counts*, wurde sie auch als spezifisch eingestuft. Im Durchschnitt lagen die spezifischen Signale bei 24.000 *counts*, während unspezifische Signale im Durchschnitt lediglich 36 *counts* erreichten.

Insgesamt wurden 48 Sonden wegen eines geringen spezifischen bzw. hohen unspezifischen Signals verworfen und Ersatzsonden entwickelt. Die Sonde TEM\_S1 zeigte beim Einsatz synthetischer Positivkontrollen immer ein unspezifisches Signal zwischen 100 und 4000 *counts*, wurde aber dennoch nicht ausgetauscht. Ein Subtyp des *bla<sub>TEM</sub>* Gens wurde in dem Plasmids pUC57, mit welchem alle synthetischen Positivkontrollen transformiert worden waren, als Selektionsmarker genutzt. Es lag auf dem Plasmid in räumlicher Nähe zu der synthetisierten Zielsequenz (vgl. Abbildung 4) und wurde bei der Amplifikation dieser zu einem gewissen Grad ebenfalls vervielfältigt. Das Signal auf der *bla<sub>TEM</sub>*-spezifischen Sonde hatte seine Ursache folglich nicht in einer Kreuzhybridisierung, sondern sie lag in der Natur der synthetischen Positivkontrollen. Da diese Konstellation natürlicherweise nicht vorkommt, war dieser Umstand in der Praxis mit keinerlei Einbußen der Spezifität der *bla<sub>TEM</sub>*-Detektion verbunden.

#### 4.9 Multiplex-PCR-Etablierung

Der erfolgreiche Nachweis aller Targets eines Microarrays erfordert es, dass alle diese in einer Multiplex-PCR amplifiziert werden können. Je mehr Produkte jedoch simultan gebildet werden sollen, desto geringer ist die Sensitivität einer PCR für jedes einzelne Target. Entsprechend kann sich die Etablierung einer Multiplex-PCR abhängig von der Art und Anzahl zu amplifizierender Targets komplex gestalten und mehrere Optimierungsschritte erfordern. Die wichtigsten sind im Folgenden ausführlicher beschrieben.

#### 4.9.1 Test einer 168-plex-PCR

In einem ersten Test wurde versucht alle Targets in einem einzigen Ansatz gleichzeitig zu amplifizieren. Hierfür wurden alle 168 Primer mit allen derzeit verfügbaren Positivkontrollen in eine Multiplex-PCR eingesetzt. In dieser sollten gleichzeitig 83 Produkte generiert und mittels Microarray detektiert werden. Die dabei beobachteten Sondensignale sind in Abbildung 12 grafisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass die 168-plex-PCR nicht leistungsstark genug war, um alle Targets simultan zu amplifizieren. Bei 45 von 83 Produkten war die Amplifikation unzureichend, so dass die generierte Signalintensität der jeweiligen spezifischen Sonde unter 1000 *counts* verblieb. Dieser Umstand konnte auch durch Veränderungen im PCR-Protokoll, wie z.B. eine veränderte  $Mg^{2+}$ - dNTP- oder Primer-Konzentration, nur unwesentlich beeinflusst werden. Verursacht wurde die mangelhafte Amplifikation einzelner Produkt dadurch, dass alle Targets in einem Ansatz um limitierte PCR-Ressourcen wie Polymerase oder dNTPs konkurrierten [112]. Generell begünstigt ist die Amplifikation von kürzeren Targets deren Primer eine hohe Affinität zu ihrem Template besitzen. Die Amplifikation von Targets, auf die diese Charakteristika nicht zutreffen, wird bei zu großem Konkurrenzdruck unterbunden. Um diesen zu reduzieren, war es nötig alle Primer in drei verschiedene Primerpools aufzuteilen.



Ergebnisse

#### 4.9.2 Einteilung von Primerpools

Um die Wahrscheinlichkeit einer Inhibition einzelner Produkte nach Einteilung aller Primer in Pools zu verringern, wurden jeweils Targets mit vergleichbarer Konkurrenzstärke zusammengefasst. Um diese zu bewerten, wurden die Targetlänge, die Affinität der zugehörigen Primer zu ihrem Template und die gemessene Signalstärke in der 168-plex-PCR jedes einzelnen Targets berücksichtigt. Die Affinität der Primer für ihr Template wurde mittels Gradienten-PCR für jedes Primerpaar experimentell ermittelt. Nahm die Produktausbeute der PCR bei zunehmender Annealingtemperatur dabei signifikant ab, wurden die Primer als niedrig affin eingestuft, während sie bei gleichbleibender Produktausbeute als hoch affin definiert wurden (s. Abbildung 13).

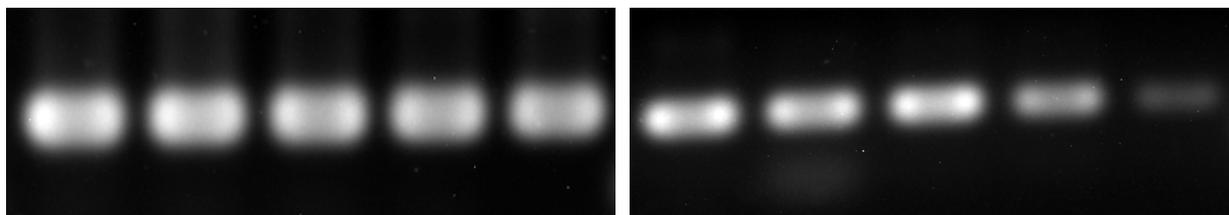


Abbildung 13: Produkte zweier Gradienten-PCRs im Gelbild. In den fünf Spuren sind jeweils die Produkte, die bei fünf verschiedenen Annealingtemperaturen (von links nach rechts: 57°C, 60°C, 63°C, 65,5°C und 67°C) generiert wurden, aufgetragen. Im linken Gelbild ist, im Gegensatz zum Rechten, bei zunehmender Annealingtemperatur keine Abnahme der Produktausbeute zu erkennen. Entsprechend erfolgte die Einteilung des hier eingesetzten Primerpaars als hoch affin, während das Primerpaar, dessen Produkte im rechten Gelbild zu sehen sind, als niedrig affin eingestuft wurde

Die gemessene Signalstärke in der 168-plex-PCR war nur bedingt geeignet, um die Konkurrenzstärke eines Targets zu bemessen. Das lag insbesondere daran, dass sich die eingesetzte Templatekonzentration der einzelnen Targets erheblich unterschied. Zwar wurde von jeder Positivkontrolle die gleiche DNA-Menge eingesetzt, doch waren einige Targets in allen Positivkontrollen enthalten, andere dagegen nur in einer einzigen. Zusätzlich enthielten die synthetischen Positivkontrollen die Zielsequenz auf einem Plasmid, das in mehreren Kopien vorlag, so dass diese, im Vergleich zu den nativen Positivkontrollen, massiv im Überschuss eingesetzt wurden. Dies spiegelte sich in den Signalintensitäten wieder: Die Targets, die durch synthetische Positivkontrollen generiert wurden, zeigten eine durchschnittliche Signalstärke von 10500 *counts*, die von nativen Positivkontrollen lediglich von 1500 *counts* (vgl. Abbildung 12). Um Targets von nativen und synthetischen Positivkontrollen zumindest untereinander vergleichen zu können,

## Ergebnisse

wurden zwei weitere 168-plex-PCRs durchgeführt. In eine wurden alle nativen Positivkontrollen eingesetzt, in die andere alle synthetischen. Auf Basis der hier generierten Daten, der Länge der Targets und den Ergebnissen der Gradienten-PCRs wurde die Einteilung der Primer in drei Primerpools vorgenommen. In Pool1 wurden Primer mit hoher Affinität zu ihrem Template, kurzen Amplifikaten und hoher Konkurrenzfähigkeit in der 168-plex eingeteilt. Weniger starke Primer wurden Pool2 bzw. schwache Pool3 zugeteilt. Die finale Primerpooleinteilung ist in Tabelle 16 angegeben.

Für alle folgenden Hybridisierungen wurde die Amplifikation der Targets in drei getrennten Ansätzen durchgeführt. Hierfür wurde die Proben-DNA in drei unterschiedlichen PCRs mit den Primern je eines Primerpools eingesetzt und die Produkte anschließend vereinigt.

Die Effizienz des modifizierten Multiplex-PCR-Protokolls wurde getestet durch die erneute simultane Amplifikation aller Positivkontrollen. In dieser sollten wiederum 83 PCR-Produkte gebildet werden. Die resultierenden Signalintensitäten nach Hybridisierung der gebildeten Produkte sind in Abbildung 14 dargestellt.



## Ergebnisse

Die simultane Amplifikation aller Targets nach dem modifizierten Protokoll mit drei Primerpools war in 77 Fällen erfolgreich. Lediglich 6 Produkte (*tetM*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>PER</sub>*) wurden in so geringem Ausmaß gebildet, dass die resultierenden Sondensignale keine 1000 *counts* erreichten. Allerdings kommt natürlicherweise kein Stamm vor, der alle eingesetzten 83 Resistenzgene in sich vereinigt. Die bisher maximal beschriebene Anzahl an Zielgenen in einem Stamm ist 29 [12]. Um die modifizierte Multiplex-PCR unter realistischeren Bedingungen zu testen, wurde der Versuch ohne den Einsatz der synthetischen Positivkontrollen wiederholt. Die von den synthetischen Positivkontrollen abgedeckten Resistenzgene besitzen meist eine geringe Prävalenz in *Acinetobacter* und durch die unnatürlich hohe Kopienzahl der Targetsequenz unterdrücken sie die Amplifikation anderer Targets. In der derzeitigen Stammsammlung waren natürliche Positivkontrollen für 58 Zielgene verfügbar. Durch den gleichzeitigen Einsatz aller natürlichen Templates wurden all diese simultan amplifiziert und mittels Microarray detektiert. Unter diesen Bedingungen konnte jedes einzelne Target mit einer Signalstärke von mindestens 1000 *counts* erfolgreich detektiert werden, während die Sonden, deren Target nicht eingesetzt wurde, eine durchschnittliche Signalstärke von 25 *counts* aufwiesen. Die modifizierte Multiplex-PCR erwies sich damit als leistungsstark genug, um die doppelte Anzahl Zielgene, die bislang maximal in einem Stamm beschrieben wurde, zu amplifizieren.

Eine Array-unabhängige Methode zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation verschiedener Produkte einer Multiplex-PCR war mit dem *Agilent Bioanalyzer* verfügbar. Das Detektionssystem basierte auf einer Kapillargelelektrophorese und war dazu in der Lage ein virtuelles Gelbild zu generieren, in welchem die detektierten PCR-Produkte als Banden dargestellt waren. Analysiert wurden die Produkte einer Multiplex-PCR, die durch den Einsatz des *Acinetobacter baumannii* Stammes AYE als Template generiert wurden. Da der Einbau von Cy3 in die PCR-Produkte deren Größe und damit ihr Laufverhalten in der Elektrophorese auf unvorhersagbare Weise beeinflusst hätte, wurde in diese PCR kein Cy3-dCTP eingesetzt. In Abbildung 15 ist das, durch den *Agilent Bioanalyzer* erstellte, virtuelle Gelbild dargestellt.

## Ergebnisse

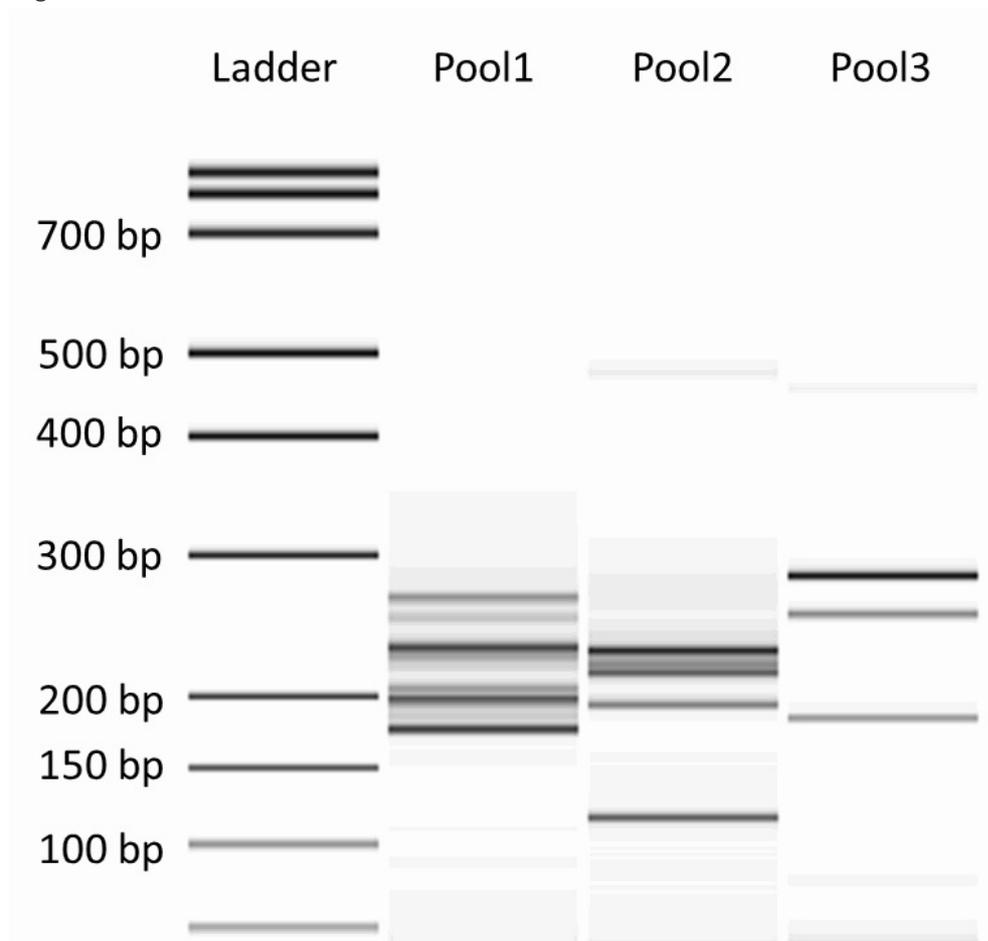


Abbildung 15: Produkte der modifizierten Multiplex-PCR mit *Acinetobacter baumannii* AYE als Template im virtuellen Gelbild des Agilent Bioanalyzers. Spur 1 enthält den Größenstandard und die Produkte der drei Primerpools sind in den Spuren 2-4 getrennt dargestellt. Die erwarteten Produkte waren: Pool1: *adeB* (157 bp), *ant(2'')-I* (180 bp), *gyrA* (182 bp), *arr* (185 bp), *strA* (195 bp), *intl* (198 bp), *cmlA* (205 bp), *bla<sub>OXA-51</sub>* (223 bp), *strB* (231 bp), *sul-1* (235 bp), *craA* (242 bp), *aac(3)-I* (257 bp), *dfrA-1* (269 bp); Pool2: *ISAbA1* (113 bp), *qacE* (143 bp), *catI* (193 bp), *adeR* (206 bp), *dfrA-10* (214 bp), *adeS* (214 bp), *tetG* (220 bp), *abeM* (222 bp), *aph(3')-I* (230 bp), *ant(3'')-Ia* (484 bp); Pool3: *bla<sub>VEB</sub>* (182 bp), *tetA* (250 bp), *floR* (277 bp), *ISAbA1-bla<sub>ADC</sub>* (392 bp), *parC* (436 bp), *bla<sub>ADC</sub>* (617 bp)

Die meisten der 29 erwarteten Produkte konnten in dem virtuellen Agarosegel erfolgreich nachgewiesen werden. Allerdings besaßen einige Produkte beinahe oder sogar exakt die gleiche Größe wie andere innerhalb des gleichen Pools, was eine eindeutige Zuordnung der Banden unmöglich machte. Des Weiteren war die Sensitivität des *Agilent Bioanalyzers* nicht ausreichend, um die Produkte *adeB* (Pool1, 157 bp), *qacE* (Pool2, 143 bp) und *bla<sub>ADC</sub>* (Pool3, 617 bp) zu detektieren, obwohl sie zu einem gewissen Anteil amplifiziert worden waren, wie eine spätere Analyse durch den Microarray bestätigte. Die Auflösung und die Sensitivität des *Agilent Bioanalyzers* wurden vom Hersteller mit 5 bp bzw. 0,1 ng DNA angegeben.

Ergebnisse

#### 4.10 Test der Arrayanalyse mit einem Referenzstamm

Ein erster Test des entwickelten Arrays und der etablierten Multiplex-PCR wurde mit dem Referenzstamm *Acinetobacter baumannii* AYE durchgeführt. Der Stamm ist vollständig sequenziert, so dass eine Kontrolle der Resultate möglich war. Die Analyse erbrachte, dass alle erwarteten Produkte erfolgreich amplifiziert und detektiert wurden, ohne dass es zu einem falsch positiven Nachweis eines Produktes kam. In Abbildung 16 ist eine Aufnahme des Microarrays bzw. in Abbildung 17 die zugehörigen Signalintensitäten der Sonden dargestellt.

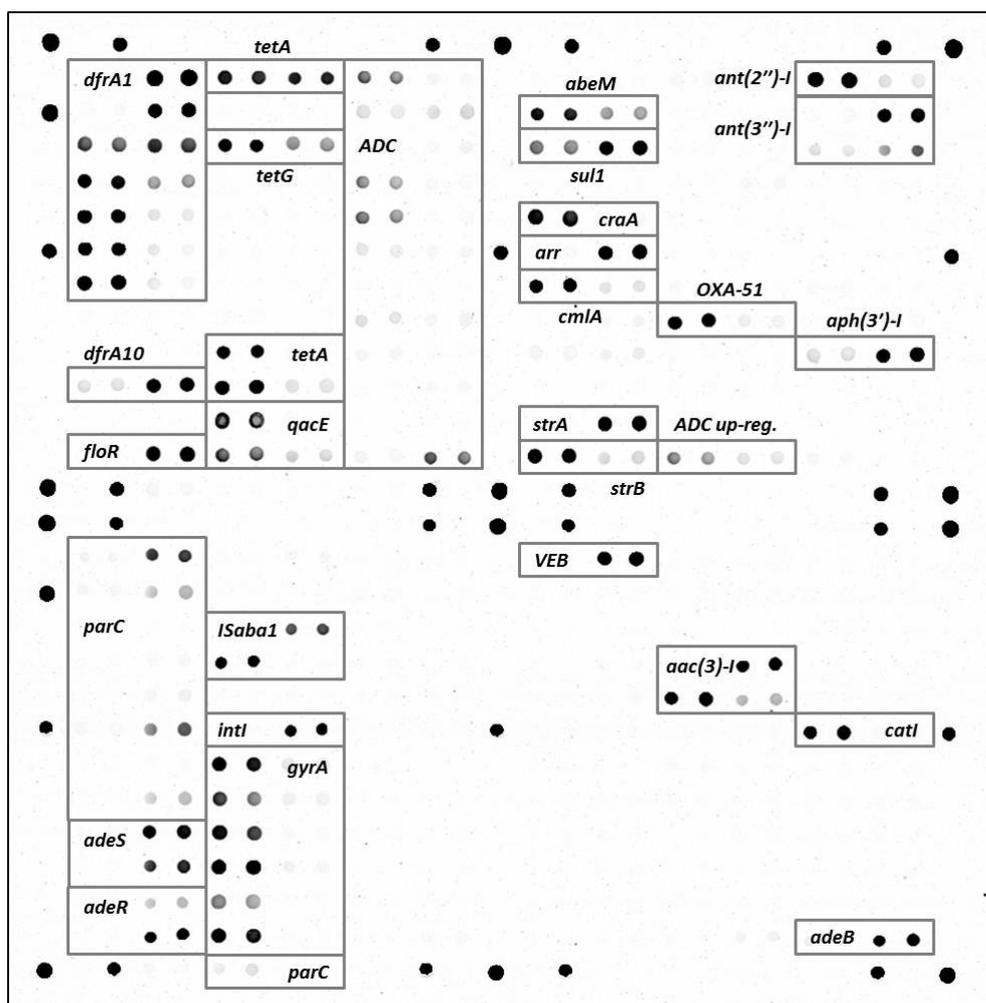
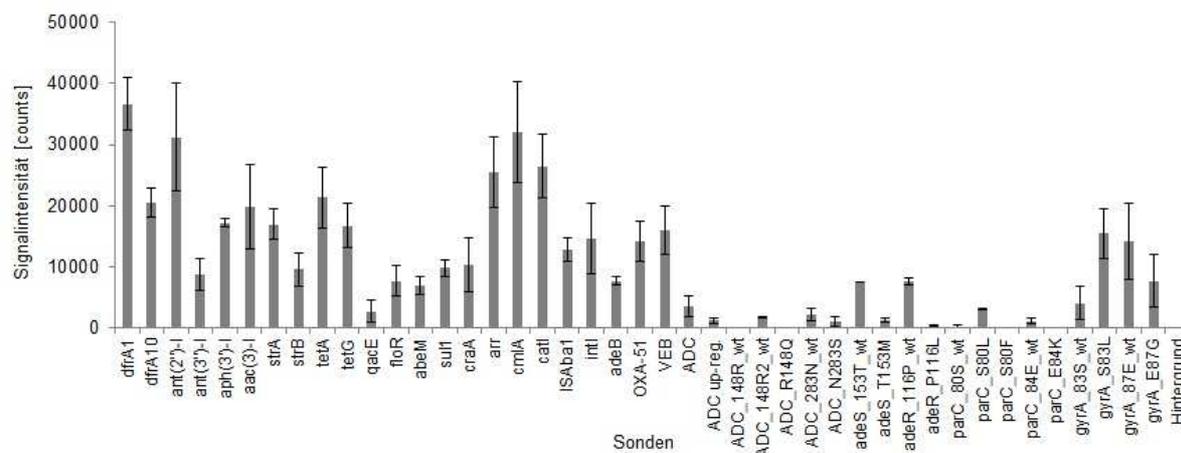


Abbildung 16: Microarrayanalyse des *A. baumannii* Stammes AYE. Sonden, die entweder auf ihrer Sense- oder Antisense-Konfiguration ein positives Signal zeigten, sind beschriftet mit dem Resistenzgen, für welches sie spezifisch sind. Sonden für das gleiche Target sind jeweils in einer Box zusammengefasst. Einzelne, nicht-beschriftete Spots sind Spotting- und Hybridisierungskontrollen

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Signalintensitäten aller Sonden der Analyse des Stammes *A. baumannii* AYE. Dargestellt sind positive Nachweise von Resistenzgenen und Integrationsorten von IS-Elementen (Säulen 1-25), die Signale der Sonden zur Detektion von SNPs welche ein MM/PM Verhältnis < 0,7 aufweisen (Säulen 26-43) sowie das Hintergrundsignal, berechnet aus dem Durchschnitt aller negativen SONDENSIGNALE (Säule 44; 9 counts). Detektierte Resistenzdeterminanten waren *dfrA1*, *dfrA10*, *ant(2'')-I*, *ant(3'')-I*, *aph(3')-I*, *aac(3)-I*, *strA*, *strB*, *tetA*, *tetG*, *qacE*, *floR*, *abeM*, *sul1*, *craA*, *arr*, *cmlA*, *catI*, *ISAbat1*, *intI*, *adeB*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>*, und *bla<sub>ADC</sub>* (hoch-reguliert), sowie SNPs in *parC* und *gyrA*, die zu den resistenz-relevanten Aminosäuresubstitutionen ParC S80L and GyrA S83L führen**

Die Reproduzierbarkeit des Protokolls wurde getestet, indem der Stamm *A. baumannii* AYE unter gleichbleibenden Bedingungen zwei weitere Male analysiert wurde. Überprüft wurde dabei zum einen, ob die qualitative Aussage des Arrays konstant blieb, zum anderen auch, ob quantitativ vergleichbare Signale erreicht wurden. Zu diesem Zweck wurde die Varianz jeder einzelnen positiven Sonde separat ermittelt. Diese errechnete sich aus dem Mittelwert der gemessenen Signale einer Sonde bei den drei Messungen, geteilt durch deren Standardabweichung. Dabei ergaben sich Werte zwischen 4% und 54%. Die durchschnittliche Varianz, gemittelt über alle positiven Sonden, lag bei 23%. Qualitativ lieferten die drei Versuche jeweils das gleiche Resultat.

#### 4.11 Test der Arrayanalyse an klinischen Isolaten

Die Funktionalität des Arrays wurde an den beiden phänotypisch und genotypisch charakterisierten Ausbruchstämmen AC8 und AC9 getestet. Die Sequenzdaten der Genome sowie ein Resistenzprofil beider Isolate wurden zusammen mit einer DNA-

## Ergebnisse

Probe von Dr. Iglauer (Labor Dr. Fenner & Kollegen, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Antibiogramme der beiden Isolate sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Antibiogramm der Isolate AC8 und AC9**

Antibiotikum	AC8	AC9
Ampicillin	R	R
Amox./Clavulan.	S	R
Cefuroxim	R	R
Ceftazidim	S	R
Cefepim	S	R
Imipenem	S	R
Meropenem	S	R
Ciprofloxacin	S	R
Levofloxacin	S	R
Tobramycin	S	R
Amikacin	S	R
Doxycyclin	S	R
Sulfa/TMP	S	R
Colistin	S	R

Beide Isolate sind hinsichtlich ihrer Resistenz sehr unterschiedlich: Während Isolat AC8 nur gegen einige wenige  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit geringer Stabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen resistent ist, so besitzt Isolat AC9 eine ausgeprägte Resistenz gegen jedes einzelne getestete Antibiotikum. Die erhaltenen DNA-Proben beider Isolate wurden mittels des neu entwickelten Microarrays analysiert und die Existenz aller detektierten Resistenzgene in den zur Verfügung gestellten Sequenzdaten überprüft. Während in Isolat AC8 lediglich intrinsische bzw. äußerst weit verbreitete Resistenzdeterminanten detektiert wurden (*bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>ADC</sub>*, *abeM*, *craA*, *adeB*), so wurde Isolat AC9 positiv getestet auf eine große Anzahl teilweise überexprimierter und äußerst effektiver Resistenzgene (*bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>* (überexprimiert), *bla<sub>ADC</sub>* (überexprimiert), *bla<sub>TEM</sub>*, *parC S83L*, *gyrA S80L*, *strA*, *strB*, *armA*, *aph(3')-I*, *tetB*, *sul2*, *abeM*, *craA*, *adeB*). Die Existenz jeder Resistenzdeterminante konnte anhand der von Dr. Iglauer zur Verfügung gestellten Sequenzdaten (nicht publiziert) verifiziert werden. Diese Daten sind nicht öffentlich zugänglich. Auch der beobachtete Phänotyp beider Isolate korrelierte mit ihrem jeweiligen Phänotyp: Die Resistenz von

## Ergebnisse

AC8 gegen Ampicillin und Cefuroxim wurde durch die Expression der intrinsischen Gene *bla*<sub>OXA-51</sub> und *bla*<sub>ADC</sub> vermittelt. Die vollständige Resistenz von AC9 gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, einschließlich der Carbapeneme, ließ sich durch die überexprimierten Gene *bla*<sub>OXA-23</sub> und *bla*<sub>ADC</sub> erklären, die Fluorchinolon-Resistenz ging auf die Mutationen in *gyrA* und *parC* zurück, die Wirkung der Aminoglykoside wurde durch die *armA* induzierte Wirkortmodifikation aufgehoben und die Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Resistenz resultiert aus den Genen *abeM* und *sul2*. Über die Ursache der Colistin-Resistenz konnte keine Aussage gemacht werden (vgl. Abschnitt 4.1).

### 4.12 Analyse anderer *Acinetobacter*-Spezies

Innerhalb der Gattung *Acinetobacter* besitzt *A. baumannii* die größte klinische Relevanz, allerdings treten in selteneren Fällen auch andere Spezies der Gattung *Acinetobacter* im klinischen Umfeld als Pathogene in Erscheinung. Da eine Differenzierung der Spezies aufgrund phänotypischer Marker in der Regel nicht möglich ist werden diese Isolate häufig als *A. baumannii* fehlinterpretiert. Beim klinischen Einsatz des Arrays muss daher damit gerechnet werden, dass er auch zur Analyse von anderen Spezies der Gattung *Acinetobacter* herangezogen wird. In diesen Fällen sollte der Array anzeigen können, dass es sich bei dem getesteten Isolat nicht um *A. baumannii* handelt und möglichst gleichzeitig eine Resistenzanalyse dessen ermöglichen. Der Mikroarray wurde ausschließlich zur Analyse von *Acinetobacter baumannii* konzipiert, allerdings kommen viele Resistenzdeterminanten in der Gattung universell vor. Um zu testen, ob sich der entwickelte Microarray auch zur Analyse anderer *Acinetobacter*-Spezies eignet, wurden 21 solcher Isolate untersucht. Deren Zugehörigkeit zur Spezies *A. baumannii* konnte aufgrund von Sequenzdaten der Gene *gyrA*, *parC* und *bla*<sub>OXA-51</sub> ausgeschlossen werden.

Die Auswertung des Arrays gestaltete sich bei diesen Isolaten problematisch. Zwar wurde eine Reihe von Resistenzdeterminanten erfolgreich detektiert, allerdings konnten auch viele Sonden mit Signalstärken zwischen 500 und 1500 *counts* beobachtet werden. Diese liegen damit knapp über bzw. unter dem Schwellenwert von 1000 *counts*, was eine eindeutige Zuordnung unmöglich machte. Eine Sequenzierung einiger dieser Targets erbrachte, dass in vielen Fällen ein Subtyp eines Resistenzgens vorlag, der sich von dem in *A. baumannii* vorkommenden

Ergebnisse

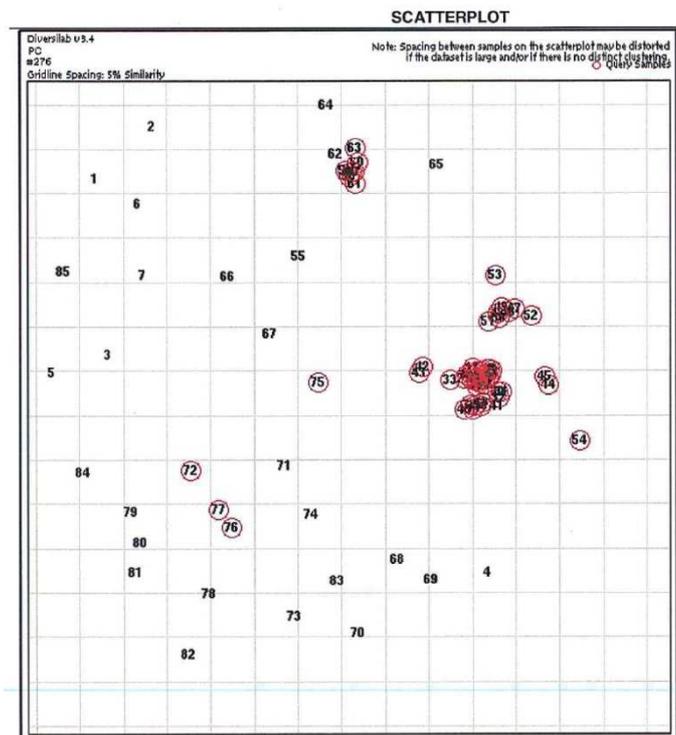
Subtyp in einigen Basen unterschied. Die damit verbundenen Basenfehlpaarungen der Primer und/oder Sonden führten zu dem stark reduzierten Signal.

Es zeigte sich, dass der Array durch den Nachweis einiger *A. baumannii* spezifischer Targets (*bla*<sub>OXA-51</sub> und diverse Punktmutationen in *parC*) dazu in der Lage war, diese Spezies von anderen Spezies zu differenzieren. Eine Resistenzanalyse dieser war allerdings nur begrenzt möglich. Die Spezifität der Detektion erwies sich zwar als sehr hoch, die Sensitivität war jedoch stark herabgesetzt.

#### **4.13 Array-Validierung mittels klinischer *A. baumannii* Isolate**

Die Leistungsfähigkeit des Arrays für die Analyse von *Acinetobacter baumannii* Isolaten wurde mit einem größeren Studienkollektiv getestet. Eingesetzt wurden 56 multiresistente Isolate, welche vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger zur Verfügung gestellt worden waren sowie zwei Isolate aus der Routinediagnostik der mikrobiologischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses und die zwei Referenzstämme *Acinetobacter baumannii* AYE und HK302. Die korrekte Speziesidentifikation aller 60 Stämme wurde mittels der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation in Verbindung mit der Flugzeitmassenspektrometrie (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometry*; MALDI-TOF-MS) bestätigt und die Stämme einer Typisierung mittels des rep-PCR basierten Diversilab-Systems zugeführt. Der damit ermittelte Verwandtschaftsgrad der verschiedenen Isolate ist in Abbildung 18 grafisch dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 18:** Scatterplot der Typisierung der 56 *Acinetobacter baumannii* Isolate des NRZ. Rot umrandete Einträge repräsentieren die getesteten Isolate, bei nicht umrandeten Einträgen handelt es sich um Referenzproben.

Nach der Typisierung der Stämme wurden diese der Microarrayanalyse zugeführt. Die Analyse wurde nach dem in Abschnitt 3.2.17 beschriebenen Protokoll durchgeführt und der positive Nachweis jedes detektierten Resistenzgens dokumentiert. In dem Kollektiv wurden insgesamt 1036 Resistenzdeterminanten detektiert, die in Form von 54 unterschiedlichen Targets nachgewiesen werden konnten. Eine vollständige Auflistung dieser Resistenzdeterminanten, einschließlich ihrer Häufigkeit, findet sich in Tabelle 9. Die anderen 38 Targets des Arrays konnten in keinem der 60 Stämme nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich meist um Resistenzgene mit sehr geringer Prävalenz bzw. solche, die nicht im deutschen Raum verbreitet sind.

## Ergebnisse

**Tabelle 9: Detektierte Resistenzdeterminanten in dem 60 *A. baumannii* Stämme umfassenden Studienkollektiv. Die Resistenzdeterminanten sind nach Typus unterteilt und sortiert nach ihrer Prävalenz**

β-Lactamasen		AME		Andere				Mobile Elemente		Punktmutationen	
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	60	<i>strA</i>	42	<i>abeM</i>	60	<i>catA</i>	4	<i>ISAba1</i>	48	<i>GyrA_S83L</i>	58
<i>bla</i> <sub>ADC</sub>	59	<i>strB</i>	42	<i>craA</i>	60	<i>floR</i>	3	<i>upstream</i> von <i>bla</i> <sub>ADC</sub>	41	<i>ParC_S80L</i>	45
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	15	<i>aph(3')-I</i>	23	<i>qacE</i>	60	<i>arr</i>	3	<i>upstream</i> von <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	14	<i>ADC_N283S</i>	7
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	14	<i>aph(3')-VI</i>	21	<i>adeB</i>	59	<i>cmIA1</i>	3	<i>upstream</i> von <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	10	<i>ADC_V208A</i>	3
<i>bla</i> <sub>OXA-40</sub>	12	<i>aac(3)-Ia</i>	19	<i>sul2</i>	39	<i>dfrA1</i>	3	integriert in <i>adeS</i>	2	<i>ParC_S80F</i>	1
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	11	<i>aac(6')-Ib</i>	15	<i>tetB</i>	31	<i>tetG</i>	1	<i>upstream</i> von <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	1		
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	8	<i>ant(3'')-Ia</i>	14	<i>sul1</i>	29	<i>qnrB</i>	1	<i>intl1</i>	32		
<i>bla</i> <sub>OXA-20</sub>	7	<i>ant(2'')-Ia</i>	13	<i>armA</i>	8	<i>catB</i>	1	<i>IS1133</i>	1		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	7	<i>aac(6')-II</i>	9	<i>dfrA7</i>	7	<i>dfrA10</i>	1				
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	1	<i>aac(3)-IIa</i>	2	<i>tetA</i>	4						
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1	<i>ant(3'')-Ib</i>	1								

**4.14 Qualitative Bewertung der Sondensignale**

Ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität eines Microarrays ist, dass sich positive und negative Signale klar differenzieren lassen. Dies war bei nahezu allen Analysen gegeben. Die durchschnittliche Signalstärke der positiven Sonden betrug 15405 *counts*. Das schwächste positive Signal einer Analyse betrug im Mittel 1663 *counts*. Das Hintergrundsignal, berechnet aus dem durchschnittlichen Signal aller negativen Sonden, lag bei 19 *counts*. Das höchste Signal pro Analyse, das noch unterhalb des Schwellenwertes von 1000 *counts* blieb, lag im Durchschnitt bei 213 *counts*. Nur in Einzelfällen zeigten Sonden eine Signalstärke zwischen 500 und 1500 *counts* und damit im Grenzbereich des Schwellenwertes. Eine graphische Darstellung aller Sondensignale, welche die beschriebene Verteilung verdeutlicht, findet sich in Abbildung 19.

Ergebnisse

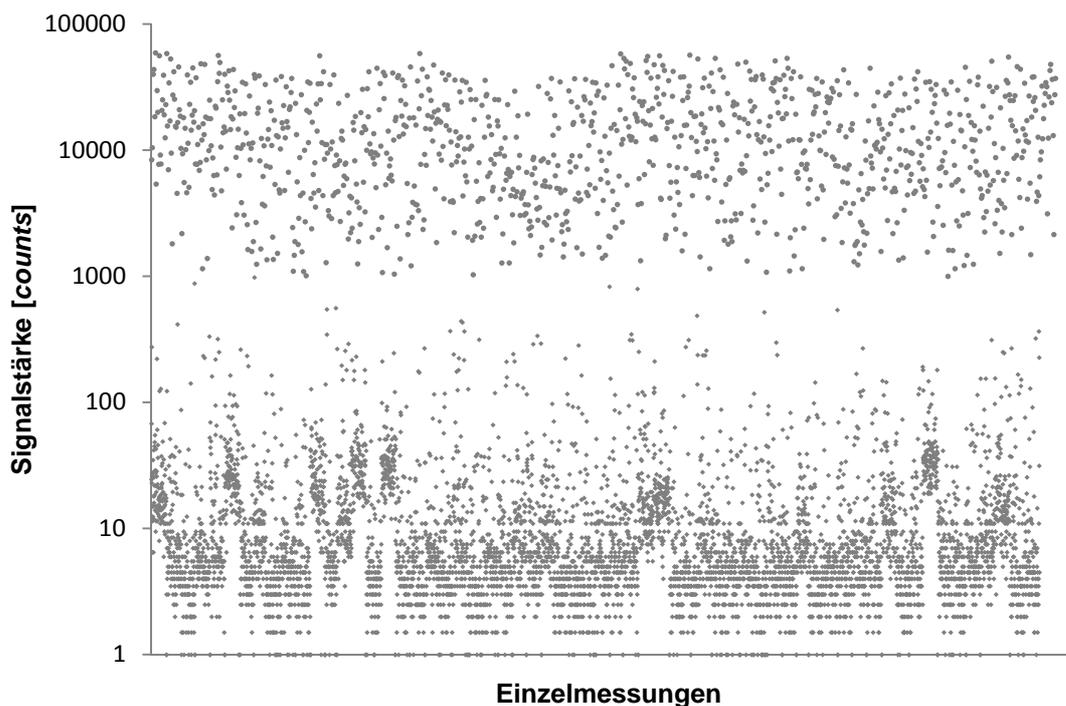


Abbildung 19: Signalstärke aller Sonden über 60 Analysen in logarithmischer Darstellung. Nicht enthalten sind Sonden zur Detektion von Punktmutationen, da bei der Interpretation dieser die absolute Signalstärke von untergeordneter Relevanz ist. Gezeigt werden damit 116 Sonden pro Analyse, woraus sich etwa 7000 Datenpunkte ergeben. Deutlich zu erkennen ist die geringe Anzahl an Datenpunkten mit Signalstärken um 1000 counts

Die SNP-Detektion des Arrays beruhte, anders als der Nachweis von Resistenzgenen oder die Integration von Insertionselementen, nicht auf einem einzigen positiven Sondersignal, sondern auf dem Verhältnis der *mismatch*-Sonde (MM) zur *perfect-match*-Sonde (PM). Für ein ausreichend eindeutiges Ergebnis muss dieses Verhältnis unter einem Wert von 0,7 liegen [71]. Gemittelt über alle 60 Analysen und alle detektierbaren Punktmutationen lag dieser Wert bei 0,15. Zwischen den verschiedenen Targets waren allerdings teils erhebliche Unterschiede zu beobachten. Das gemittelte Signalverhältnis MM/PM der 11 detektierbaren Punktmutationen im Einzelnen ist in Tabelle 10 angegeben.

**Tabelle 10: MM/PM-Verhältnis der SNP-detektierenden Sonden gemittelt über 60 Analysen**

Target	Durchschnittliches MM/PM-Verhältnis
parC 251	0,09
parC 262	0,04
adeS	0,24
adeR	0,07
gyrA 242	0,19
gyrA 254	0,16
ADC 148	0,08
ADC 208	0,02
ADC 210	0,02
ADC 215	0,02
ADC 283	0,38

Im Durchschnitt lagen die Sondenverhältnisse der einzelnen Targets somit unterhalb des Schwellenwertes von 0,7. Dennoch wurde dieser bei insgesamt 9 Analysen im Fall des Targets *bla<sub>ADC</sub>* 283 überschritten. In diesen Fällen war keine Aussage darüber möglich, ob der jeweilige Probenstamm an der bezeichneten Position dem Wildtyp oder der Mutante entsprach. Dies konnte erst nach Sequenzierung des *bla<sub>ADC</sub>* Gens der jeweiligen Isolate aufgeklärt werden.

Die Detektion des Integrationsortes der mobilen genetischen Elemente war bei einem Großteil der Fälle, in denen eines dieser Elemente nachgewiesen wurde, möglich. Das Element IS1133 konnte nur ein einziges Mal detektiert werden und in diesem Fall konnte der Integrationsort nicht bestimmt werden. Das Element ISAba1 wurde dagegen in 48 Isolaten detektiert. In 6 Fällen konnte der Integrationsort des Elements nicht aufgeklärt werden. Der Typisierung der Isolate (vgl. Abbildung 18) war zu entnehmen, dass diese 6 Stämme der gleichen klonalen Linie entstammten und auch ihr Repertoire an weiteren Resistenzdeterminanten war identisch. Dies ließ vermuten, dass auch der Integrationsort des ISAba1 in allen 6 Isolaten der gleiche war, auch wenn dieser nicht lokalisiert werden konnte. In 42 Fällen konnte der Integrationsort bzw. die Integrationsorte - wenn mehrfach in einem Isolat vorliegend - des ISAba1 Elements bestimmt werden.

#### 4.15 Zeitbedarf der Arrayanalyse

Für die Bearbeitung einer Probe mussten ca. 4h veranschlagt werden. Darin enthalten waren 30 min für die DNA-Isolation aus einer Kolonie von *Acinetobacter baumannii* mittels des *MagNA Pure Compact*, 2h für die Durchführung der Multiplex-

Ergebnisse

PCR, 1h für die Hybridisierung und weitere 30 min für das Waschen und Auslesen der Arrays.

#### 4.16 Einzelanalyse jedes Isolats

Im klinischen Einsatz soll der Array dazu in der Lage sein, den Genotyp eines Isolats zu bestimmen, auf dessen Basis der Phänotyp abgeschätzt werden kann. Die Tauglichkeit des entwickelten Systems zur Bestimmung des Phänotyps klinischer Isolate wurde getestet, indem für jedes mit dem Array analysierte Isolat ein mutmaßlicher Phänotyp vorausgesagt wurde. Hierfür wurde für jede Resistenzdeterminante, welche von dem Microarray nachgewiesen werden kann, ermittelt, gegen welche Antibiotika sie eine Resistenz vermittelt. Das Resistenzprofil jeder detektierten Resistenzdeterminante ist in Tabelle 11 dargestellt. Der vorausgesagte Resistenzphänotyp eines Isolates bestimmte sich aus der Summe der Resistenzprofile der Resistenzdeterminanten die es trug.

Die Ermittlung des Resistenzprofils einiger Resistenzdeterminanten gestaltete sich allerdings oftmals problematisch. Zum einen war dies der Fall bei Resistenzdeterminanten, von denen verschiedene Subtypen existieren, die vom Array nicht unterschieden werden konnten, aber jeweils ein anderes Substratspektrum besitzen. So gibt es beispielsweise Subtypen der TEM  $\beta$ -Lactamase, die dazu in der Lage sind, Ceftazidim zu hydrolysieren und solche, die das nicht sind. Zum anderen ist das Ausmaß der Resistenz, die durch ein Resistenzgen vermittelt wird, von dessen Expressionslevel abhängig. Beobachtet wurde dies z.B. bei den Effluxpumpen kodierenden Genen *adeB* und *abeM*. Das genaue Expressionslevel der Gene lässt sich allerdings nur über eine Quantifizierung der jeweiligen mRNA ermitteln. Der vorliegende Microarray wurde jedoch nicht für die Analyse von Transkriptomen konzipiert. Auch die Interpretation von Genen, die nur eine gering ausgeprägte Resistenz vermitteln, ist problematisch. So vermittelt beispielsweise das Gen *qnrB* lediglich eine schwach ausgeprägte Resistenz gegen Ciprofloxacin, die jedoch in der Regel nicht ausreicht um dessen Wirksamkeit signifikant einzuschränken. Allerdings entwickelt sich im Verlauf einer länger andauernden antibiotischen Therapie mit Ciprofloxacin in solchen Isolaten häufig eine stark ausgeprägte Resistenz. Die Detektion des *qnrB* Gens stellt somit, trotz seiner eingeschränkten Wirksamkeit, eine Kontraindikation für den Einsatz von Ciprofloxacin dar.

## Ergebnisse

In der klinischen Praxis führt ein falsch-positives Resultat bei der Sensitivitätstestung eines Isolats dazu, dass ein eigentlich wirksames Antibiotikum nicht gegeben wird. Sofern andere geeignete Therapieoptionen zur Verfügung stehen, stellt dies jedoch für den Patienten keine Beeinträchtigung dar. Ein falsch-negatives Resultat dagegen führt bei Einsatz des entsprechenden Antibiotikums mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Versagen der Therapie, mit möglicherweise fatalen Konsequenzen für den Patienten. Aus diesem Grund wurden Resistenzdeterminanten, die potentiell dazu in der Lage sind eine Resistenz auszulösen, als resistenzauslösend interpretiert, selbst solche, die dies mit nur mäßiger Wahrscheinlichkeit tun. Diese Strategie provoziert zwar potentiell falsch-positive Nachweise durch den Array, senkt jedoch im klinischen Einsatz das Risiko für Patienten auf ein Therapieversagen.

## Ergebnisse

**Tabelle 11: Resistenzprofil aller detektierten Resistenzdeterminanten. Angegeben ist für jede Determinante, ob sie zur Ausprägung einer Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum führen kann („+“) oder ob es keinen Einfluss darauf hat („-“).**

	PIP/TAZ	CZ	IMI	MEM	TMP	SMX	AMK	GEN	TOB	CIP	TIG
<i>bla<sub>OXA-20</sub></i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>OXA-23</sub> + ISAb1</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>OXA-40</sub></i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>+ ISAb1</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>+ ISAb1</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>ADC</sub></i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>+ ISAb1</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>GES</sub></i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>strA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>strB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(3')-I</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(3')-VI</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>aac(3)-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>aac(6')-Ib</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>ant(3'')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ant(2'')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>aac(6')-II</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>aac(3)-IIa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>ant(3'')-Ib</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>abeM</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>craA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qacE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>adeABC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>adeS + ISAb1</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>sul1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>armA</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>tetA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dfrA1</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>dfrA7</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>dfrA10</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>floR</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>arr</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cmlA1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>catA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>catB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>gyrA_S83L</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>parC_S80L</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>parC_S80F</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>ADC_N283S</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ADC_V208A</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>intl1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>IS1133</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ISAb1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam; CZ: Ceftazidim, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazol, AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, CIP: Ciprofloxacin, TGC: Tigecyclin

\* Die Ausprägung der Resistenz, die durch die jeweilige Resistenzdeterminante gegen das jeweilige Antibiotikum vermittelt wird, ist gering oder abhängig von der Expressionsrate des Gens oder dem vorliegenden Subtyp. Für die Auswertung wurde die Resistenzdeterminante als Resistenz-vermittelnd angenommen, auch wenn dies nicht der Fall sein musste.

Ergebnisse

#### 4.17 Korrelation des Genotyps und Phänotyps

Von jedem analysierten Isolat wurde mittels des VITEK2 ein Antibiogramm erstellt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Eine Zusammenfassung der phänotypischen Resistenzanalyse ist in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Resistenzverhalten des Studienkollektivs im Überblick. Dargestellt ist die Verteilung der 60 *A. baumannii* Stämme in die Kategorien „sensibel“, „intermediär resistent“ und „resistent“ hinsichtlich 11 verschiedener Antibiotika. In der letzten Spalte sind die MHK-Grenzwerte angegeben, die der Klassifizierung durch den VITEK2 zugrunde liegen**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär resistent	Resistent	MHK-Grenzwerte [mg/L]
Piperacillin/Tazobactam	2	0	58	S: ≤ 16; R: > 128
Ceftazidim	2	1	57	S: ≤ 8; R: > 32
Imipenem	6	0	54	S: ≤ 2; R: > 8
Meropenem	6	0	54	S: ≤ 2; R: > 8
Trimetoprim/Sulfamethoxazol	5	0	55	S: ≤ 2; R: > 4 <sup>(1)</sup>
Amikacin	23	9	28	S: ≤ 8; R: > 16
Gentamicin	7	12	41	S: ≤ 1; R: > 4
Tobramycin	17	11	32	S: ≤ 1; R: > 4
Ciprofloxacin	2	0	58	S: ≤ 1; R: > 1
Tigecyclin	0	58	2	S: - ; R > 4 <sup>(2)</sup>
Colistin	60	0	0	S: ≤ 2; R: > 2

<sup>(1)</sup> Wert gibt die Konzentration des Trimethoprimis an; <sup>(2)</sup> Für Tigecyclin existieren keine MHK Schwellenwerte nach DIN Norm für *Acinetobacter*; vom VITEK2 werden unabhängig von der gemessenen MHK alle *Acinetobacter*-Isolate mindestens als intermediär resistent eingestuft

Der auf Basis der detektierten Resistenzdeterminanten vorhergesagte Resistenzphänotyp jedes einzelnen Isolats wurde mit dem experimentell ermittelten Phänotyp verglichen. Als übereinstimmend wurden die Ergebnisse für das jeweilige Antibiotikum gewertet, wenn das Isolat resistent war und der Array eine dafür verantwortliche Resistenzdeterminante detektieren konnte (echt-positiv) bzw. wenn das Isolat sensibel war und der Array auch keine entsprechende Resistenzdeterminante detektieren konnte (echt-negativ). Keine Übereinstimmung lag vor, wenn keine auslösende Resistenzdeterminante in einem resistenten Isolat ermittelt werden konnte (falsch-negativ) bzw. wenn eine Resistenzdeterminante

Ergebnisse

detektiert wurde, das Isolat sich phänotypisch aber als sensibel erwies (falsch-positiv). Im Folgenden werden die Ergebnisse der Geno- bzw. Phänotypisierung für die verschiedenen Antibiotika detailliert miteinander verglichen.

#### 4.17.1 Piperacillin/Tazobactam

Von den 60 getesteten Isolaten waren lediglich 2 sensibel gegenüber Piperacillin/Tazobactam. In diesen beiden konnte auch keine Resistenzdeterminante mit einer Wirksamkeit gegen dieses Antibiotikum nachgewiesen werden. In den anderen 58 resistenten Isolaten wurden Gene für verschiedene  $\beta$ -Lactamasen identifiziert. Darunter waren *bla<sub>ADC</sub>* (überexprimiert) (n=41), *bla<sub>ADC</sub>* mit Punktmutationen, welche für die ESBLs ADC V208A und N283S (n=7 bzw. 3) kodieren, *bla<sub>OXA-23</sub>* (überexprimiert) (n=14), *bla<sub>NDM</sub>* (n=7), *bla<sub>VIM</sub>* (n=1) und *bla<sub>GES</sub>* (n=8). Von der  $\beta$ -Lactamase GES existieren verschiedene Subtypen, die sich einerseits hinsichtlich ihrem Substratspektrum unterscheiden, andererseits auch hinsichtlich ihrer Inhibierbarkeit durch Inhibitoren wie Tazobactam. Die Wirksamkeit der GES  $\beta$ -Lactamase gegen Piperacillin/Tazobactam ist somit nur in bestimmten Fällen gegeben. In 7 Isolaten wurden neben dem *bla<sub>GES</sub>* Gen auch noch weitere Resistenzdeterminanten gegen Piperacillin/Tazobactam detektiert, so dass sich die Ursache der Resistenz nicht eindeutig zuordnen ließ. In einem Fall lag *bla<sub>GES</sub>* aber als einzige Resistenzdeterminante mit potentieller Aktivität gegen Piperacillin/Tazobactam vor. In diesem Fall war das Vorliegen einer Inhibitor-resistenten Variante von GES hoch wahrscheinlich.

Insgesamt stimmte der vorhergesagte Phänotyp mit dem experimentell ermittelten für Piperacillin/Tazobactam in allen Isolaten überein. Die Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp war somit zu 100% erfolgreich.

#### 4.17.2 Ceftazidim

Bei der phänotypischen Charakterisierung wurden 2 Ceftazidim-sensible sowie 58 resistente Isolate identifiziert. Während in den beiden sensiblen Isolaten auch keine entsprechenden Resistenzdeterminanten detektiert werden konnten, so fand sich in den resistenten Isolaten eine Reihe von Genen für  $\beta$ -Lactamasen. Abgesehen von dem Gen *bla<sub>OXA-23</sub>* sind für die Ceftazidim-Resistenz die gleichen Gene verantwortlich, wie für die Piperacillin/Tazobactam-Resistenz. Weitere Gene, die

Ergebnisse

potentiell zur Resistenzausprägung gegen Ceftazidim führen konnten, waren *bla<sub>TEM</sub>* (n=15) und *bla<sub>SHV</sub>* (n=1).

#### 4.17.3 Imipenem & Meropenem

Durch die Vorselektion eines Großteils der Stämme des Studienkollektivs hinsichtlich eines multiresistenten Phänotyps, der in den meisten Fällen mit einer Carbapenem-Resistenz assoziiert war, war die Anzahl detektierter Carbapenemasen hoch. So wurden in den 54 Carbapenem-resistenten Isolaten die Gene *bla<sub>OXA-23</sub>* (überexprimiert) (n=14), *bla<sub>NDM</sub>* (n=7), *bla<sub>VIM</sub>* (n=1) und *bla<sub>GES</sub>* (n=8), *bla<sub>OXA-40</sub>* (n=12), *bla<sub>OXA-58</sub>* (n=11) und *bla<sub>OXA-51</sub>* (überexprimiert) (n=10) detektiert.

Nicht alle Subtypen von *GES* besitzen Carbapenemase-Aktivität [81]. In 7 Fällen trugen die *bla<sub>GES</sub>*-positiven Isolate noch ein weiteres Gen für eine Carbapenemase, das für den resistenten Phänotyp verantwortlich sein könnte. In einem Fall jedoch war *bla<sub>GES</sub>* die einzige detektierbare Ursache für die Carbapenem-Resistenz. Hier lag mit hoher Wahrscheinlichkeit ein *GES* Subtyp mit der Fähigkeit Carbapeneme zu hydrolysieren vor.

In einem einzigen Fall zeigte sich ein Isolat sensibel gegenüber Carbapenemen, trotz des positiven Nachweises der Resistenzdeterminante *bla<sub>OXA-58</sub>*. Dieses Resultat musste folglich als falsch-positiv bewertet werden. *OXA-58* besitzt im Vergleich zu den anderen  $\beta$ -Lactamasen der Ambler Klasse D mit der Fähigkeit Carbapeneme zu hydrolysieren nur geringe Carbapenemase-Aktivität. Diese ist beispielsweise um den Faktor 4 geringer als bei *OXA-40* [48]. So trägt *OXA-58* zwar zur Resistenz bei, zu deren vollständiger Ausprägung müssen aber noch weitere Faktoren, wie andere Carbapenemasen, eine veränderte Membranpermeabilität oder ein anderes Expressionsprofil der Penicillin-bindenden Proteine hinzukommen [113, 114]. Die Detektion von *bla<sub>OXA-58</sub>* ist somit lediglich ein Indiz für eine Carbapenem-Resistenz. Da die antibiotische Therapie eines *bla<sub>OXA-58</sub>* positiven Isolats mit Carbapenemen aber mit einem deutlich erhöhten Risiko des Therapieversagens behaftet ist, ist der Nachweis dieses Gens dennoch von klinischer Relevanz.

Die Stämme vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhaus-erreger wurden dort im Vorfeld mittels Singleplex-PCR auf Carbapenemasen gescreent und diese gegebenenfalls sequenziert, um deren genauen Subtyp festzustellen. In Tabelle 13 sind die Daten dieser Untersuchung den Daten der Microarrayanalyse gegenübergestellt.

**Tabelle 13: Detektierte Gene für Carbapenemasen, nachgewiesen durch den Microarray im Vergleich zu Singleplex-PCR-Ergebnissen des NRZ**

Microarray Daten		Singleplex-PCR Daten des NRZ	
Detektierte Gene	Fälle	Detektierte Gene	Fälle
bla <sub>OXA-23</sub> -ähnlich	14	bla <sub>OXA-23</sub>	14
bla <sub>OXA-40</sub> -ähnlich	13	bla <sub>OXA-72</sub> <sup>(1)</sup>	13
bla <sub>OXA-58</sub> -ähnlich	11	bla <sub>OXA-58</sub>	9
		bla <sub>OXA-164</sub> <sup>(2)</sup>	2
ISAba1-bla <sub>OXA51</sub> -ähnlich	10	ISAba1-bla <sub>OXA51</sub> -ähnlich	10
bla <sub>VIM</sub>	1	bla <sub>VIM</sub>	1
bla <sub>GES</sub>	8	bla <sub>GES-11</sub> <sup>(3)</sup>	1
bla <sub>NDM</sub>	7	bla <sub>NDM-1/-6</sub>	6
		bla <sub>NDM-2</sub>	1

<sup>(1)</sup> OXA-72 zählt zu den OXA-40-ähnlichen  $\beta$ -Lactamasen; <sup>(2)</sup> OXA-164 zählt zu den OXA-58-ähnlichen  $\beta$ -Lactamasen; <sup>(3)</sup> Carbapenem-resistente Isolate wurden nur auf bla<sub>GES</sub> getestet, wenn keine andere Carbapenemase detektiert werden konnte

Die beiden unterschiedlichen Methoden erbrachten für jedes einzelne Isolat übereinstimmende Ergebnisse. Lediglich die Anzahl der positiven bla<sub>GES</sub> Nachweise war bei der Singleplex-PCR-Detektion geringer. Ursache hierfür war, dass das Screening am NRZ bla<sub>GES</sub> routinemäßig nicht mit einschloss. Nur wenn kein anderes Gen als Ursache einer phänotypischen Resistenz ausgemacht werden konnte, wurde das entsprechende Isolat auf bla<sub>GES</sub> getestet.

#### 4.17.4 Sulfamethoxazol/Trimethoprim

Eine Resistenz gegen Trimethoprim und Sulfamethoxazol liegt nur dann vor, wenn ein Isolat sowohl gegen Trimethoprim als auch Sulfamethoxazol eine Resistenz entwickelt hat. Ursache der phänotypischen Resistenz sind also immer mindestens zwei unterschiedliche Resistenzdeterminanten. Die Trimethoprim-Resistenz ist in *Acinetobacter baumannii* weit verbreitet, wegen der Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen allerdings molekularbiologisch schwierig nachzuweisen. Auslöser einer Trimethoprim-Resistenz können verschiedene Subtypen des *dfrA* Gens sein, wie sie auch in 11 Isolaten des Studienkollektivs detektiert wurden, aber auch Mutationen der chromosomal kodierten Dihydrofolatreduktase, Veränderungen der

Ergebnisse

äußeren Membran oder Effluxmechanismen, wie z.B. die *AbeM*-Pumpe. Diese Pumpe vermittelt zwar lediglich eine basale Resistenz gegen Trimethoprim, ist allerdings intrinsisch in *Acinetobacter baumannii* und so wurde ihr Gen auch in jedem einzelnen Isolat positiv nachgewiesen. Daher sind meist die Resistenzmechanismen gegen Sulfamethoxazol ausschlaggebend für einen resistenten Phänotyp gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim. Von den 55 Sulfamethoxazol/Trimethoprim-resistenten Isolaten wurden 16 positiv auf *sul1*, 26 auf *sul2* und 13 auf *sul1* und *sul2* getestet. Die 5 sensiblen Stämme waren negativ für *sul1* und *sul2*. Damit war die Korrelation von Genotyp und Phänotyp in allen 60 getesteten Isolaten gegeben.

#### 4.17.5 Aminoglykoside

Die Vorhersage des Phänotyps auf Basis genotypischer Daten war für die Aminoglykoside Amikacin, Gentamicin und Tobramycin problematisch. Die Literatur beschreibt viele Fälle von widersprüchlichen Ergebnissen der phänotypischen und genotypischen Charakterisierung von klinischen Isolaten [115, 116]. Erschwerend hinzukommt, dass in vielen Fällen mehrere Resistenzdeterminanten für Aminoglykoside in einem Isolat auftraten, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussten. So wurden innerhalb des Studienkollektivs Isolate mit 2 bis 7 Resistenzdeterminanten für Aminoglykoside identifiziert. Der am häufigsten vertretene Resistenzmechanismus war dabei die enzymatische Modifikation des Wirkstoffs durch Aminoglykosid-modifizierende-Enzyme (AME), aber Efflux und Modifikation der Zielstruktur kamen ebenfalls vor [117]. Resistenzdeterminanten, welche die Wirksamkeit von Amikacin, Gentamicin und Tobramycin gleichzeitig beeinflussen, sind *armA* (n=8) und die Insertion von ISAb1 in das Gen *adeS* (n=2). Auch das Gen *aac(6')-Ib* wird in der Analyse als Resistenzgen gegen alle drei Aminoglykoside gewertet. Allerdings ist bei diesem das Substratspektrum abhängig von wenigen Punktmutationen, so dass *aac(6')-Ib*-positive Isolate empfindlich gegenüber Amikacin oder Gentamicin verbleiben können. Das Gen wurde in 15 Isolaten detektiert. Von diesen waren aber nur 12 resistent gegen Amikacin bzw. 14 gegen Gentamicin. Auch nur 6 der 8 *armA*-positiven Isolate waren resistent gegenüber Amikacin. Ursache der Abweichung bei den 2 sensiblen Isolaten war allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit ein falsch-negatives Ergebnis des VITEK2. Die häufig fehlerhafte Charakterisierung von *armA*-positiven *Acinetobacter* Isolaten hinsichtlich der Amikacin-Resistenz durch den VITEK2 ist bereits ausführlich in der

## Ergebnisse

Literatur beschrieben [116]. Weitere detektierte Resistenzdeterminanten mit Einfluss auf die Wirksamkeit der Aminoglykosidantibiotika waren *aph(3')-VI* (n=21), *aac(6')-II* (n=9) *aac(3)-Ia* (n=19), *aac(3)-IIa* (n=2) und *ant(2'')-Ia* (n=13). Entgegen den Erwartungen verblieb auch eines der *ant(2'')-Ia*-positiven Isolate empfindlich gegenüber Tobramycin. Die Ursache hierfür konnte nicht aufgeklärt werden, das tatsächliche Vorhandensein des Gens konnte aber mittels Singleplex-PCR verifiziert werden. Ein falsch-negatives Ergebnis lieferte der Array in zwei Fällen Amikacin-resistenter Isolate. Auch hier ließ sich die Ursache nicht aufklären. In allen anderen Fällen konnte der Phänotyp eines Isolates erfolgreich mit dem jeweiligen Genotyp korreliert werden.

### 4.17.6 Ciprofloxacin

Der häufigste detektierte Mechanismus der Ciprofloxacin-Resistenz war eine Punktmutation in dem Gen *gyrA*, welche zum mutierten Protein *GyrA* S83L führt. Diese konnte in allen 58 resistenten Isolaten nachgewiesen werden. Eine Mutation in *parC*, die zum mutierten Protein *ParC* S80L bzw. *ParC* S80F führte und die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen weiter herabsetzte, konnte in 46 bzw. 1 Isolat nachgewiesen werden. In einem weiteren Isolat konnte das Resistenzgen *qnrB* detektiert werden, welches allerdings nur eine basale Resistenz gegen Ciprofloxacin vermitteln kann. Die Auswirkung dieses Gens auf das Resistenzverhalten des Isolats wurde durch die gleichzeitig vorliegende Mutation in *gyrA* maskiert.

### 4.17.7 Tigecyclin

Die molekularbiologische Detektion von Resistenzdeterminanten, die die Empfindlichkeit gegenüber Tigecyclin herabsetzten, stellte sich problematisch dar. Ursache hierfür war die Vielzahl unterschiedlicher Mutationen in den Genen *adeS* und *adeR*, die dafür verantwortlich sein können [118-120]. Diese waren durch den entwickelten Array nur teilweise detektierbar. So wurde auch nur in 2 Isolaten eine entsprechende Resistenzdeterminante gefunden – in beiden Fällen die Insertion des mobilen Elements ISAb1 in das Gen *adeS*. Während eines der beiden Isolate auch einen resistenten Phänotyp zeigte, so war bei dem anderen nur eine erhöhte MHK von 4 mg/ml zu beobachten. Diese kann von klinischer Relevanz sein, so dass auch dieses falsch-positiv gewertete Resultat des Microarrays beachtenswert war. Ein

## Ergebnisse

weiteres Isolat zeigte eine phänotypische Resistenz, ohne dass der Array einen Hinweis auf eine solche liefern konnte. In diesem Fall war der Nachweis falsch-negativ. Die äußerst geringen Fallzahlen Tigecyclin-resistenter Isolate, in Kombination mit den beiden falsch charakterisierten Isolaten, führte zu einer äußerst geringen Sensitivität und Spezifität des Arrays im Hinblick auf den Tigecyclin-Resistenznachweis. Um verlässlichere statistische Daten zu generieren, wäre es nötig, eine größere Anzahl Tigecyclin-resistenter Isolate zu analysieren.

#### 4.18 Sensitivität und Spezifität des Arrays

Die Ergebnisse der Korrelation des Genotyps und Phänotyps für alle getesteten Antibiotika sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Dort sind auch die daraus kalkulierten Werte für die Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (*positive predictive value*; PPV) und negativer Vorhersagewert (*negative predictive value*; NPV) angegeben.

**Tabelle 14: Statistische Auswertung der Korrelation von Genotyp und Phänotyp der einzelnen Isolate. Angegeben ist die absolute Anzahl echt-positiver (EP), echt-negativer (EN), falsch-positiver (FP) und falsch-negativer (FN) Resultate des Arrays hinsichtlich der Vorhersage des Resistenz-Phänotyps. Ebenfalls enthalten sind die daraus berechneten Größen positiver Vorhersagewert (PPV), negativer Vorhersagewert (NPV), Sensitivität (SEN) und Spezifität (SPZ) sowie deren Mittelwert**

Antibiotikum	EP	EN	FP	FN	PPV	NPV	SEN	SPZ
PIP/TAZ	58	2	0	0	100	100	100	100
CZ	58	2	0	0	100	100	100	100
IPM	54	5	1	0	98	100	100	83
MEM	54	5	1	0	98	100	100	83
SXT	55	5	0	0	100	100	100	100
AMK	35	18	5	2	88	90	95	78
GEN	53	6	1	0	98	100	100	86
TOB	43	16	1	0	98	100	100	94
CIP	58	2	0	0	100	100	100	100
TGC	1	57	1	1	50	98	50	98
Gewichteter Mittelwert					98.3	97.7	99.5	93.7

PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam; CZ: Ceftazidim, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazol, AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, CIP: Ciprofloxacin, TGC: Tigecyclin

Die Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp von 60 Isolaten hinsichtlich 10 verschiedener Antibiotika konnte für 587 Einzelanalysen erfolgreich durchgeführt

Ergebnisse

werden, während in 13 Fällen voneinander abweichende Ergebnisse vorlagen. 10 falsch-positive Resultate waren entweder auf eine fehlerhafte phänotypische Charakterisierung zurückzuführen oder mit einem Subtyp-abhängigen Resistenzmuster einzelner Resistenzgene assoziiert. In keinem Fall wurde ein Resistenzgen positiv angezeigt, das nicht tatsächlich präsent war, wie eine Nachtestung durch Singleplex-PCR bestätigte. Lediglich in 3 Fällen lieferte der Array ein falsch-negatives Ergebnis. Ob für diese Fälle eine nicht durch den Array erfasste Resistenzdeterminante verantwortlich war oder ob die Detektion eines Targets fehlschlug, konnte nicht ermittelt werden.

#### **4.19 Untersuchung des Hybridisierungsmechanismus**

Einige theoretische und praktische Aspekte der Microarraytechnologie wurden im Laufe der Dissertation beobachtet, die sich mit gegenwärtigen Modellen des Hybridisierungsprozesses nicht in Einklang bringen ließen. Aus diesem Grund wurden weitere Hybridisierungsexperimente durchgeführt, mit dem Ziel diese Effekte zu charakterisieren und gegebenenfalls deren Ursache aufzudecken.

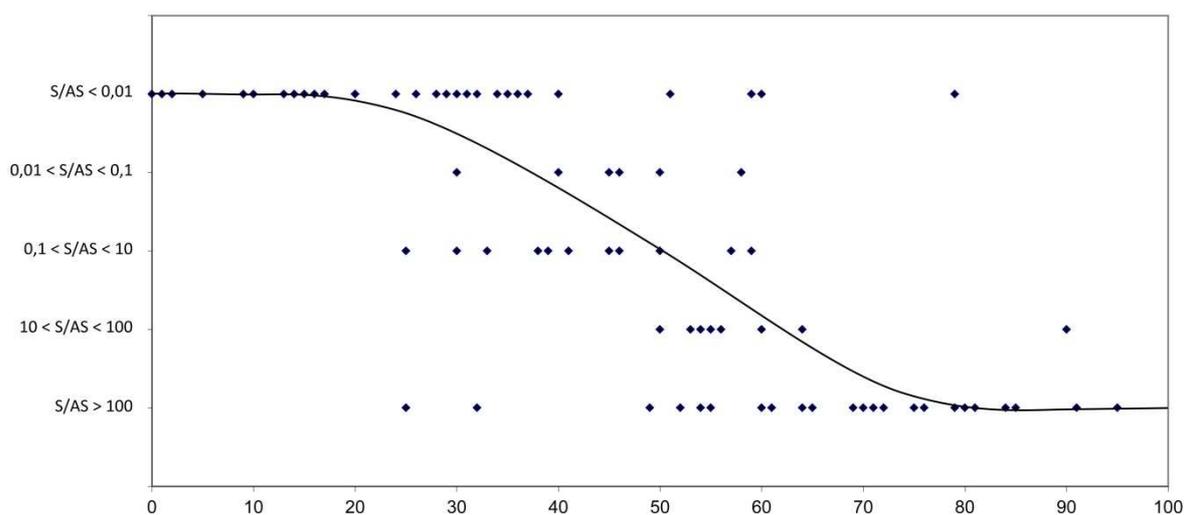
##### **4.19.1 Konformations-Selektivität der PCR-Produkte**

Theoretisch können doppelsträngige PCR-Produkte sowohl mit ihrem Sense-Strang (gebildet durch Elongation des Forward-Primers) an die Antisense-Konformation einer Sonde binden als auch mit ihrem Antisense-Strang (gebildet durch Elongation des Reverse-Primers) an die Sense-Konformation der Sonde. Somit sollten sowohl Sense- als auch Antisense-Sonde ein Signal liefern, wenn das entsprechende PCR-Produkt auf dem Array hybridisiert wird. Tatsächlich ist allerdings in den meisten Fällen nur auf einer der beiden Sonden ein Signal detektierbar bzw. das Signal der einen Sonde liegt um mehrere Größenordnungen über dem der anderen Sonde [121, 122]. Maßgeblich Einfluss auf die Konformations-Selektivität der PCR-Produkte nimmt die Position der Sonde innerhalb des Targets. Ist die Sonde dem Forward-Primer nahe gelegen, so zeigt mit hoher Wahrscheinlichkeit die Antisense-Konfiguration der Sonde ein stärkeres Signal als die Sense-Konfiguration. Ist die Sonde dem Reverse-Primer nahe gelegen verhält es sich meist umgekehrt.

Die Häufigkeit, mit der eine deutliche Selektivität eines PCR-Produkts für die Sense- oder Antisense-Konformation einer Sonde vorkam, wurde anhand mehrerer

## Ergebnisse

Hybridisierungsreaktionen retrospektiv ermittelt. Herangezogen wurden hierfür Hybridisierungen mit Templates, die als Positivkontrollen bei der Validierung des entwickelten Microarrays eingesetzt worden waren. Für alle positiven Sonden wurde das Verhältnis der Signalintensitäten von Sense- und Antisense-Konformation (S/AS-Verhältnis) errechnet. Es zeigte sich, dass in weniger als 15% der Fälle die Signalstärken beider Konformationen einer Sonde in der gleichen Größenordnung lagen. In mehr als 85% der Fälle lag die Signalstärke der einen Sonde damit um mehr als das zehnfache über der der anderen, was eine starke Konformations-Selektivität indizierte. Der Einfluss der Position der Sonden relativ zu ihrem jeweiligen Ziel-PCR-Produkt wurde dabei auch ermittelt. In Abbildung 20 ist das S/AS-Verhältnis der Sonden in Abhängigkeit von ihrer Position dargestellt.



**Abbildung 20:** Größenordnung des S/AS-Verhältnisses von 76 Sonden in Abhängigkeit von deren Position. Die Position einer Sonde wurde einem Wert von 0-100 zugeordnet, welcher sich berechnet aus dem Abstand der Sonde zum Forward-Primer, geteilt durch die Länge des PCR-Produkts, abzüglich der Primerlängen und multipliziert mit 100. Ein Wert von 0 bedeutet entsprechend, dass die Sonde direkt an den Forward-Primer angrenzt, ein Wert von 100, dass sie an den Reverse-Primer angrenzt. Bei der eingezeichneten Kurve handelt es sich um eine manuell erstellte, idealisierte Trendlinie

Wie Abbildung 20 zu entnehmen ist, zeigte nur eine begrenzte Zahl an Sonden eine signifikante Abweichung von der idealisierten Trendlinie. Lediglich Sonden, die in der Mitte ihres jeweiligen Targets positioniert sind, zeigen keine eindeutige Tendenz in ihrem Hybridisierungsverhalten. Die Daten bestätigen damit das in der Literatur beschriebene Verhalten der Sonden. Auch in Abbildung 16 ist zu erkennen, dass nur

Ergebnisse

ein sehr geringer Anteil der Sonden ein Signal sowohl auf der Sense- als auch der Antisense-Konformation aufweist.

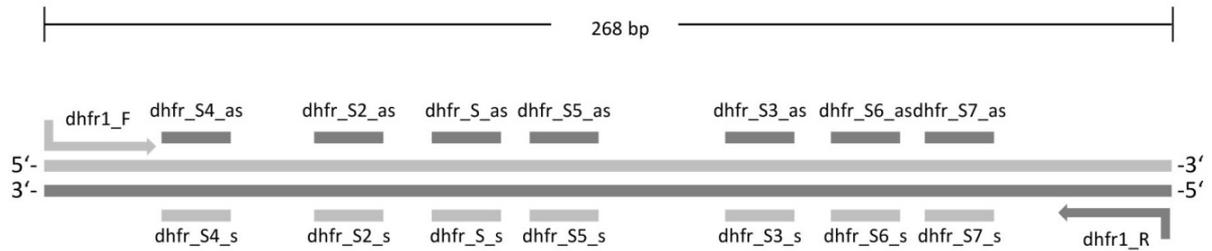
#### **4.19.2 Umkehr der Konformations-Selektivität eines PCR-Produkts**

Die Selektivität eines PCR-Produkts nur an die eine oder die andere Sondenkonformation zu binden war bei Wiederholungen der Hybridisierung unter gleichbleibenden Bedingungen konstant. Unter bestimmten Umständen konnte diese Selektivität allerdings umgekehrt werden. So konnte beispielsweise eine Sonde, die in einem Experiment ein stärkeres Signal auf der Sense-Konformation aufwies, unter anderen Bedingungen ein stärkeres Signal auf der Antisense-Konformation zeigen. Im Folgenden wird der Effekt der Umkehr der Konformations-Selektivität des jeweiligen PCR-Produkts als „UKS“ abgekürzt.

Im Zuge der Microarrayentwicklung hatte sich gezeigt, dass sich in manchen Fällen eine UKS erreichen ließ, wenn die Primerkonzentration in der PCR modifiziert wurde. Dies wurde versucht anhand der Analyse des sequenzierten Referenzstammes *Acinetobacter baumannii* AYE zu reproduzieren. Zu diesem Zweck wurde die Microarrayanalyse des Stammes nach Standardprotokoll, allerdings mit den drei Primerkonzentrationen 150 nM, 50 nM und 17 nM in der PCR durchgeführt. Von den 30 enthaltenen Targets des Stammes zeigte sich bei 3 Sonden eine Verschiebung der Selektivität des PCR-Produktes von der Sense-Sonde zur Antisense-Sonde und bei weiteren 3 Sonden in umgekehrte Richtung.

Bei diesem Versuch wurde das Verhalten einer großen Anzahl Sonden unter einer sehr begrenzten Anzahl unterschiedlicher Bedingungen getestet. Um die Komplexität des Versuchs herabzusetzen, gleichzeitig aber mehr Datenpunkte zu generieren, wurde eines der Targets bestimmt, welches ausführlich untersucht werden sollte. Ausgewählt wurde das Target *dfrA1*. Der von den eingesetzten Primern *dhfr1\_F* und *dhfr1\_R* amplifizierte Bereich umfasste 268 Basen. In diesem Bereich wurden weitere 6 Sonden entwickelt, so dass insgesamt 7 Sonden zur Detektion dieses Targets zur Verfügung standen. Ein Schema, wie die Primer und Sonden auf dem Target verteilt waren, findet sich in Abbildung 21.

## Ergebnisse

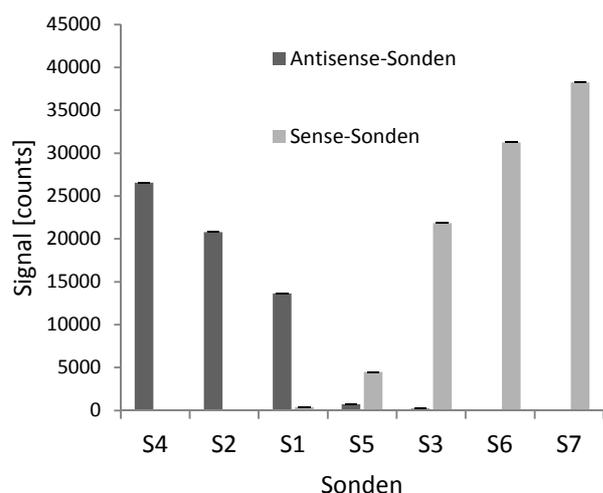


**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Position des Forward- und Reverse-Primers (hellgrauer bzw. dunkelgrauer Pfeil), sowie der 7 Sonden in Sense- und Antisense-Orientierung (hellgraue bzw. dunkelgraue Balken) auf dem 268 Basen langen Template.**

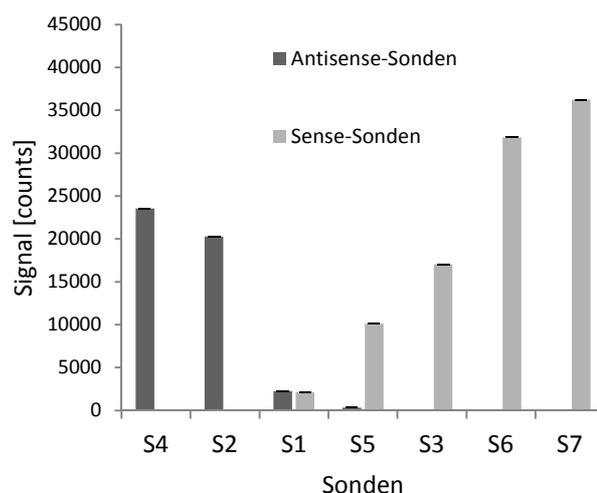
Das Verhalten dieser 7 Sonden wurde in einer Serie von Hybridisierungen, in welche nur das Produkt *dfrA1* eingesetzt wurde, untersucht. Die Singleplex-PCRs, welche das Produkt generierten, wurden mit 8 unterschiedlichen Primerkonzentrationen durchgeführt. Getestet wurden die Konzentrationen 333 nM, 267 nM, 233 nM, 217 nM, 200 nM, 183 nM, 150 nM und 117 nM. Die Daten der Versuche mit den 4 höchsten Primerkonzentrationen sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Diagramme der Versuche mit Primerkonzentrationen unter 217 nM unterschieden sich qualitativ nicht signifikant von dem mit 217 nM und werden daher nicht gezeigt.

## Ergebnisse

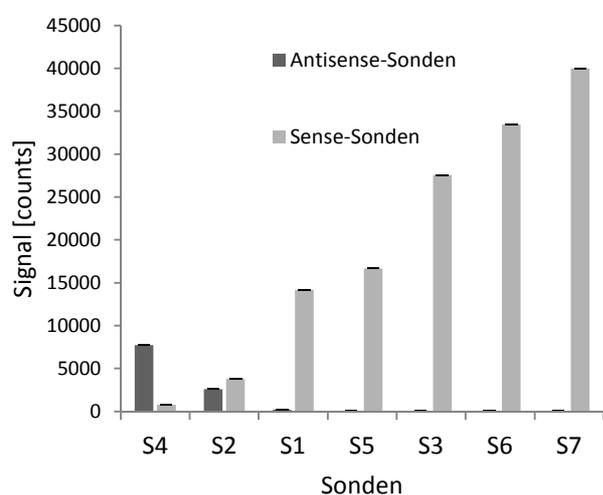
A: Primerkonzentration 333 nM



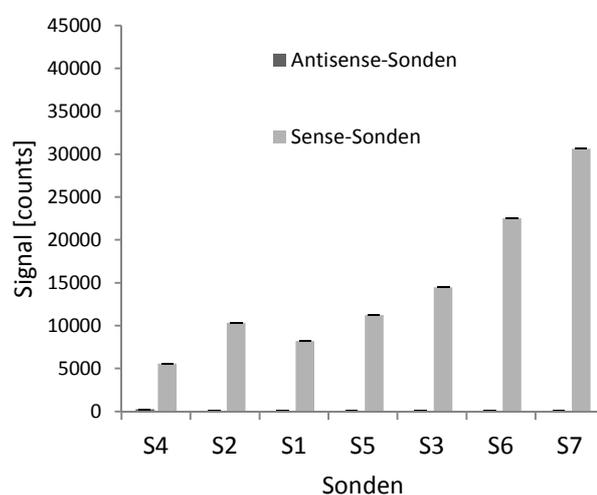
B: Primerkonzentration 267 nM



C: Primerkonzentration 233 nM



D: Primerkonzentration 217 nM



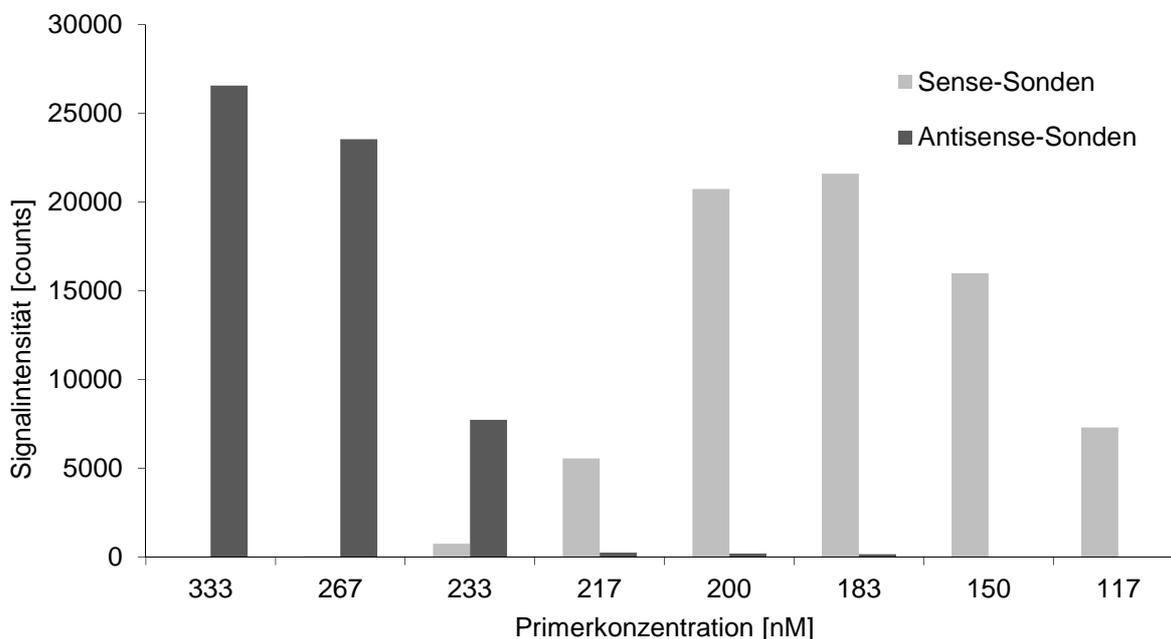
**Abbildung 22: Signalintensitäten der *dhfrA1* spezifischen Sonden *dhfr1\_S1* - *dhfr1\_S7* (Abgekürzt als S1-S7) in Sense- und Antisense-Konformation nach Hybridisierung mit ihrem spezifischen Target. Dieses wurde in einer PCR bei unterschiedlichen Primerkonzentrationen hergestellt**

Bei den höheren Primerkonzentrationen 333 nM und 267 nM (Abbildung 22 Diagramm A und B) zeigte sich das typische Muster: Sonden nahe dem Forward-Primer (S4 und S2) wiesen ein sehr niedriges S/AS-Verhältnis auf und Sonden nahe dem Reverse-Primer (S3, S6 und S7) zeigten ein sehr hohes S/AS-Verhältnis. Bei den geringeren Primerkonzentrationen 233 nM und 217 nM erhöhte sich der Anteil der Sonden mit sehr hohem S/AS-Verhältnis auf bis zu 100%.

Bei Betrachtung des Verhaltens einer einzelnen Sonde bei allen 8 Primerkonzentrationen zeigte sich, dass die UKS schon bei minimalen

## Ergebnisse

Konzentrationsänderungen beobachtet werden kann. In Abbildung 23 sind exemplarisch die Daten von Sonde dhfr1\_S4 in allen 8 Hybridisierungen dargestellt.



**Abbildung 23: Signalstärke der Sense- und Antisense-Konformation der Sonde dhfr1\_S4 in 8 Hybridisierungen mit bei unterschiedlicher Primerkonzentration generiertem PCR-Produkt**

Für Sonde dhfr1\_S4 fand die UKS bei einer Primerkonzentration zwischen 233 nM und 217 nM statt. Diese geringe Konzentrationsänderung führte zu einem Anstieg des S/AS-Verhältnisses um mehr als den Faktor 200 (von 0,098 auf 20,4). Bei einem Vergleich der Daten von den Primerkonzentrationen 267 nM und 200 nM fiel dieser Faktor mit über 45.000 noch bedeutend größer aus.

Weiterführende Versuche mit Primerkonzentrationen von über 333 nM bzw. unter 117 nM folgten dem Trend, der sich in den 8 obig gezeigten Datenpunkten bereits abzeichnet. Während bei weiter steigenden Primerkonzentrationen das Signal der Antisense-Sonde noch geringfügig anstieg, so tendierte das Signal der Sense-Sonde bei extrem niedrigen Primerkonzentrationen gegen null. Die Ursache des Rückgangs des Signals bei niedrigen Primerkonzentrationen war mit hoher Wahrscheinlichkeit die damit verbundene stark verringerte Produktausbeute. Bei sehr hohen Primerkonzentrationen konnte der gegenteilige Effekt für die leichte Steigerung der Signalstärke verantwortlich gemacht werden. Das Verhalten der Sonde um 225 nM war dagegen mit derzeitigen Modellen nicht zu erklären.

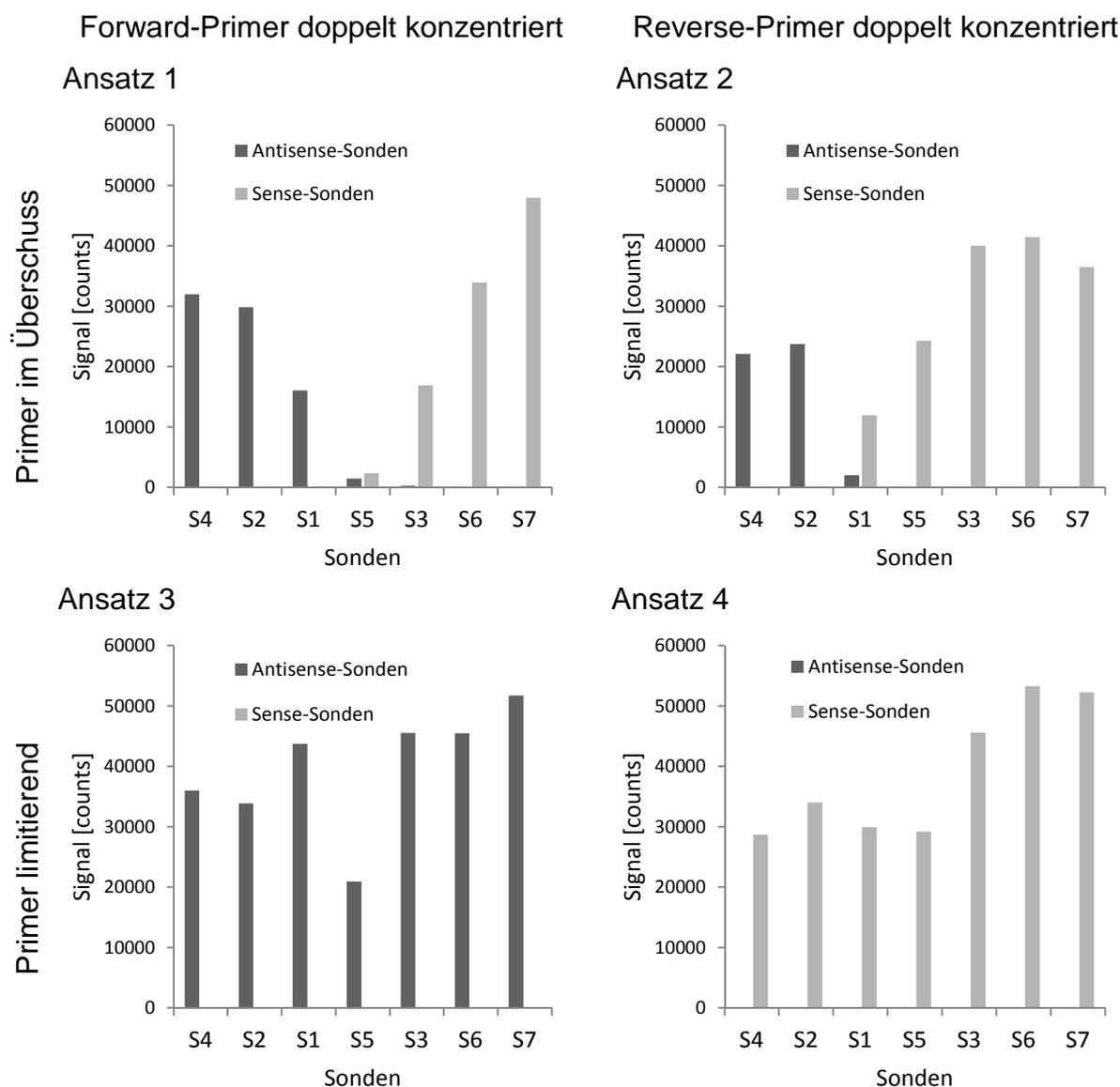
Ergebnisse

#### **4.19.3 Hybridisierungsverhalten der Produkte einer asymmetrischen PCR**

Vorangegangene Versuche deuteten darauf hin, dass das Hybridisierungsverhalten von PCR-Produkten stark von der Primerkonzentration in der PCR abhängt. Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine asymmetrische Primerverteilung auf die Hybridisierungsreaktion hat, wurde das Target *dfrA1* in verschiedenen asymmetrischen PCRs amplifiziert und die Produkte auf dem Array hybridisiert. Getestet wurden je Forward- oder Reverse-Primer in doppelter Konzentration und jeweils bei hoher und niedriger Gesamtprimerkonzentration. Die resultierenden Signalintensitäten sind in Abbildung 24 dargestellt.

## Ergebnisse

	F-Primer [nM]	R-Primer [nM]
Ansatz 1	556	277
Ansatz 2	277	556
Ansatz 3	111	56
Ansatz 4	56	111



**Abbildung 24:** Signale der 7 dfrA1-spezifischen Sonden nach Hybridisierung mit dem in verschiedenen asymmetrischen PCRs hergestelltem Produkt dfrA1. Die beiden oberen Diagramme zeigen die Ergebnisse bei hoher, die unteren beiden bei niedriger Gesamtprimerkonzentration. Die Diagramme der linken Spalte zeigen die Versuche mit doppelt konzentriertem Forward-Primer, die der rechten Spalte mit doppelt konzentriertem Reverse-Primer

Die Hybridisierungen der Produkte der asymmetrischen PCR zeigten, dass bei hoher Gesamtprimerkonzentration das genaue Verhältnis von Forward- und Reverse-Primer nur geringen Einfluss auf das S/AS-Verhältnis der Sonden hat. Bei erheblich

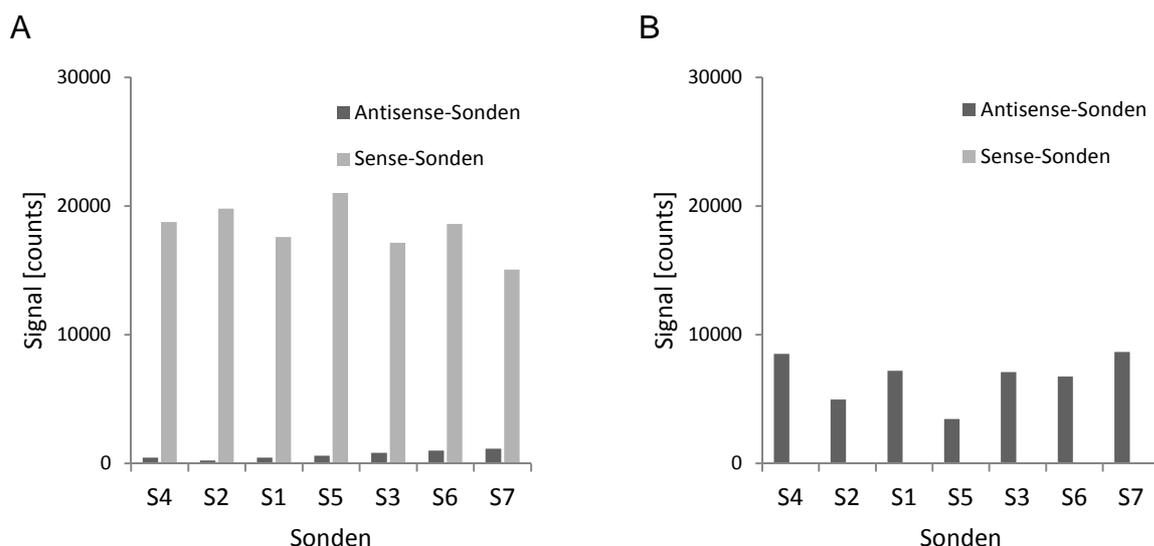
Ergebnisse

niedrigeren Primerkonzentrationen war das Gegenteil der Fall. Hier beeinflusste der Primer, der in doppelter Konzentration eingesetzt wurde, maßgeblich das S/AS-Verhältnis aller Sonden.

Eine asymmetrische PCR wird typischerweise eingesetzt, um einen der beiden DNA-Stränge des Produktes im Überschuss zu erzeugen. Ob der Überschuss eines Stranges für das in Abbildung 24 gezeigte Hybridisierungsverhalten verantwortlich ist, wurde in weiteren Versuchen eruiert.

#### 4.19.4 Test des Einflusses von ssDNA auf Hybridisierungen

Um den Einfluss reiner ssDNA in definierter Menge auf das Hybridisierungsverhalten von PCR-Produkt an Sonden untersuchen zu können, wurde der chemisch synthetisierte Sense-Strang des *dfrA1* Targets von der *Metabion AG* bezogen. Dieser synthetische, nicht markierte Einzelstrang wurde dem Hybridisierungsansatz des unter Standardbedingungen hergestellten PCR-Produkts zugesetzt. Um den Effekt des Einzelstranges beurteilen zu können, wurde die gleiche Menge des PCR-Produkts ohne Zusatz von synthetischer ssDNA hybridisiert. Das PCR-Produkt wurde mit einer Forward- und Reverse-Primerkonzentration von je 150 nM generiert und die synthetische ssDNA in einer Endkonzentration von 20 nM eingesetzt. Die erzeugten Signalintensitäten sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Signalintensitäten der 7 *dfrA1*-spezifischen Sonden bei Hybridisierung mit dem *dfrA1*-PCR-Produkt (A) und mit dem gleichen Produkt, dem synthetischer Einzelstrang (Sense-Orientierung) zugesetzt wurde (B)**

## Ergebnisse

Die Zugabe von synthetischem Sense-Einzelstrang in den Hybridisierungsmix des PCR-Produktes *dfrA1* führte zum vollständigen Signalverlust aller Sense-Sonden, die ohne zusätzliche ssDNA ein starkes Signal lieferten. Im Gegenzug nahm das Signal der Antisense-Sonden massiv zu.

Als Kontrollexperiment wurde der Versuch mit einer anderen Markierungsmethode wiederholt. Dabei wurde auf den Einsatz von Cy3-dCTP in die PCR verzichtet und stattdessen nur der Reverse-Primer mit Cy3 markiert. Das bei dem Versuch erzeugte Signalmuster unterschied sich qualitativ nicht von dem der anderen Markierungsmethode (vgl. Abbildung 25).

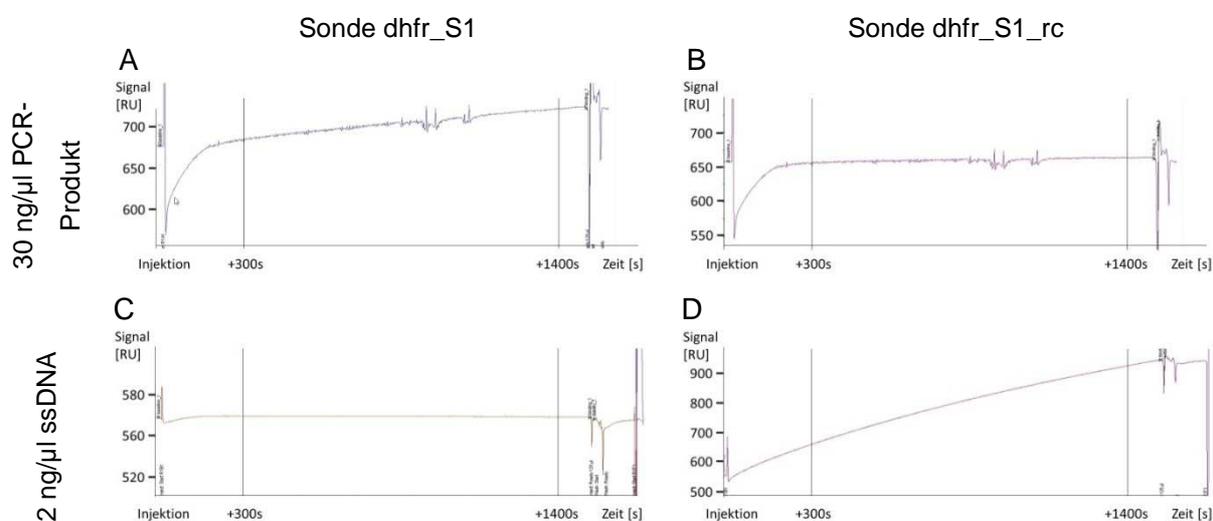
### **4.19.5 Messung der Hybridisierungseffizienz von ssDNA und PCR-Produkt**

Einzelsträngige DNA zeigte in verschiedenen Versuchen ein anderes Hybridisierungsverhalten als doppelsträngige DNA. Um Unterschiede in der Hybridisierungsgeschwindigkeit quantifizieren zu können, wurde die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie eingesetzt. Gemäß der in Abschnitt 3.2.21 beschriebenen Methodik wurden die Hybridisierungsgeschwindigkeiten von PCR-Produkt (*dfrA1*), ssDNA (synthetischer Einzelstrang) und Kombinationen aus diesen beiden mit den Sonden KPC\_S (Negativkontrolle), *dhfr1\_S3* und *dhfr1\_S3\_rc* ermittelt. Das PCR-Produkt wurde unter einem Überschuss an Primern (500 nM) hergestellt. Gemessen wurde jeweils die Signalzunahme in *response units* (RU) an allen drei Sonden gleichzeitig. Das Signal der Kontrollsonde KPC\_S war in jedem Experiment 0 und wurde nicht weiter betrachtet. Die eingesetzten Konzentrationen an Proben-DNA und die erzeugten Signalstärken sind in Tabelle 15 dargestellt. Die vollständigen Datensätze sind exemplarisch für die Ansätze „2 ng/μl ssDNA“ und „30 ng/μl PCR-Produkt“ in Abbildung 26 gezeigt.

## Ergebnisse

**Tabelle 15: Ergebnisse der OPRS Messungen. Getestet wurde die Hybridisierungsgeschwindigkeit von ssDNA und PCR-Produkt bzw. einer Mischung aus beiden mit den Sonden dhfr\_S1 und dhfr\_S1\_rc**

Probe	Signaländerung auf dhfr1_S [RU]	Signaländerung auf dhfr1_S_rc [RU]
Wasser	0	0
2 ng/μl ssDNA	0	268
4 ng/μl ssDNA	0	361
6 ng/μl ssDNA	0	379
30 ng/μl PCR-Produkt	36	6
30 ng/μl PCR-Produkt + 2 ng/μl ssDNA	13	109
30 ng/μl PCR-Produkt + 4 ng/μl ssDNA	2	226
30 ng/μl PCR-Produkt + 6 ng/μl ssDNA	0	269

**Abbildung 26: Ausgabe des Biacore Oberflächenplasmonenresonanzspektrometers bei der Hybridisierung der Proben „2 ng/μl ssDNA“ (C und D) und „30 ng/μl PCR-Produkt“ (A und B) auf den Sonden dhfr\_S1 und dhfr\_S1\_rc. Gezeigt wird der Signalverlauf in RU bis 1500s nach der Injektion der Probe. Ausgewertet wurde die Signaländerung im Zeitraum von 300s bis 1400s nach Injektion**

Der Signalanstieg der Antisense-Sonde bei Einsatz von ssDNA (in Sense-Orientierung) war extrem hoch im Vergleich zum PCR-Produkt, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die ssDNA in erheblich geringerer Konzentration eingesetzt worden war. Ein Signalanstieg auf der Sense-Sonde war, wie zu erwarten, nicht detektierbar. Die Konzentrationsreihe mit ssDNA deutete darauf hin, dass die eingesetzten Konzentrationen ausreichen, um der Bindekapazität der immobilisierten Sonden nahe zu kommen. Andernfalls wäre eine lineare Korrelation zwischen DNA-Konzentration und Signalanstieg zu erwarten gewesen. Auch der in Abbildung 26 D gezeigte abgeflachte Kurvenverlauf wies darauf hin. Die tatsächliche Hybridisierungsgeschwindigkeit dürfte also noch über dem experimentell ermittelten Wert liegen. Auch die Ergebnisse der Hybridisierungen mit PCR-Produkt deckten sich mit den Erwartungen. Hier wurde sowohl auf der

## Ergebnisse

Sense- als auch der Antisense-Sonde ein nur sehr moderater Signalanstieg beobachtet. Der Signalzuwachs auf der Sense-Sonde war dabei um den Faktor 6 höher als auf der Antisense-Sonde. Der Zusatz von ssDNA zu dem PCR-Produkt resultierte in einem deutlich geringeren Signal der Sense-Sonde bei massivem Signalzuwachs auf der Antisense-Sonde. Dieser erreichte allerdings nicht den Wert, den die gleiche Menge ssDNA ohne PCR-Produkt erbrachte. Bei allen drei gemessenen Konzentrationen an ssDNA führte der Zusatz von PCR-Produkt zu einem geringeren Signalzuwachs (109, 226 und 269 RU gegenüber 268, 361 und 379 RU). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass ein Teil des PCR-Produkts einzelsträngig vorlag und so mit dem reaktiven, synthetischen Einzelstrang hybridisieren konnte, was dessen Affinität zu den Sonden stark reduzierte.

## 5. Diskussion

Nosokomiale Infektionen durch *Acinetobacter baumannii* stellen in medizinischen Einrichtungen weltweit ein ernstes Problem dar. Als Konsequenz seiner Fähigkeit die verschiedensten Antibiotika-Resistenzdeterminanten zu akkumulieren hat sich die Spezies in den letzten Dekaden zu einem Problemkeim entwickelt. Seine ausgeprägte Antibiotikaresistenz in Kombination mit seiner hohen Toleranz gegenüber Umwelteinflüssen einschließlich Austrocknung und Desinfektionsmitteln machen *Acinetobacter* zu einem schwer beherrschbaren Erreger nosokomialer Infektionen. Die Prävalenz von extrem- bis hin zu panresistenten Stämmen steigt in besorgniserregender Geschwindigkeit.

Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit ein Microarray einschließlich eines Protokolls entwickelt zur Detektion von Resistenzdeterminanten in *Acinetobacter baumannii*. Mit diesem lassen sich innerhalb von 4h therapierelevante Informationen über den vorliegenden Genotyp generieren. Dies ermöglicht die rasche Anpassung der antibiotischen Therapie kritisch erkrankter Patienten.

Die beiden zentralen Arbeitsschritte, Multiplex-PCR und Microarray-Hybridisierung wurden während dieser Entwicklung mehrfach optimiert und ihre Leistungsfähigkeit experimentell ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Multiplex-PCR dazu in der Lage ist mindestens doppelt so viele Targets simultan zu amplifizieren als bislang maximal in einem *Acinetobacter baumannii* Isolat beschrieben wurden [12]. Die Hybridisierung der Targets an die Sonden des Microarrays erwies sich als hoch spezifisch und sensitiv. Auch die Vorhersage eines Resistenz-Phänotyps auf Basis der generierten Daten deckte sich in 98% der Fälle mit dem experimentell ermittelten Phänotyp. Im Folgenden werden die generierten Ergebnisse und die Bedeutung des Microarrays für die Diagnostik von *Acinetobacter baumannii* Infektionen diskutiert.

### 5.1 Bewertung der Sondensignale

Eine Differenzierung der positiven und negativen Sonden mittels des Grenzwertes von 1000 *counts* ermöglichte in beinahe allen Fällen eine eindeutige Bewertung der Sondensignale. Lediglich in 0,7% der Fälle wurden Signalstärken zwischen 500 und 1500 *counts* beobachtet, die sich nicht eindeutig zuordnen ließen. Vereinzelt wurden

Diskussion

die jeweiligen Isolate auf die nicht eindeutig identifizierten Targets mittels Singleplex-PCR untersucht. Hierbei wurde in jedem Fall das entsprechende Target nachgewiesen. Dies indiziert, dass die Signale knapp über 1000 *counts* korrekt als positiv ausgegeben wurden, Signale knapp unter diesem Grenzwert allerdings evtl. falsch-negativ bewertet wurden. In Anbetracht des äußerst niedrigen Hintergrundsignals der echt-negativen Signale wäre eine Absenkung des Grenzwertes auf unter 1000 *counts* möglich. Wie in Abbildung 19 gezeigt, wären von dieser Modifikation der Bewertungskriterien nur extrem wenige Signale betroffen, dennoch ließe sich damit die Sensitivität des Nachweises geringfügig steigern. Bei der Festlegung des Schwellenwertes auf beispielsweise 900 counts lägen nur noch 0,6% der Signalstärken nahe diesem Wert. Auch die Einführung Sonden-spezifischer Grenzwerte, die sich für jede Sonde individuell, beispielsweise mittels der *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse, berechnen ließen, könnte zu einer weiteren Erhöhung der Sensitivität des Arrays führen [123]. Hierfür wären allerdings experimentelle Daten für jede Sonde in den Zuständen positiv und negativ notwendig. Die ROC-Analyse wäre somit nicht für Sonden anwendbar gewesen, die während der Validierung nie bzw. immer ein positives Signal lieferten.

## 5.2 Bewertung der verschiedenen Detektionsstrategien

Die Detektion von Punktmutationen mittels zweier Sonden hat sich in den meisten Fällen als zuverlässig erwiesen. Lediglich im Fall des Targets blaADC 283 war die Differenzierung von Wildtyp und Mutante in 9 Fällen nicht eindeutig möglich. Die ungenügende Charakterisierung dieses Targets war vermutlich in der Länge der dafür spezifischen Sonden begründet. Der nachzuweisende SNP lag in einem AT-reichen Abschnitt des Gens *bla<sub>ADC</sub>*. Entsprechend waren die Sonden ebenfalls AT-reich, so dass diese mit einer Länge von 32 Basen entwickelt werden mussten, um eine hinreichend hohe Schmelztemperatur zu erreichen. Bei dieser Länge war ein einziger *Mismatch* offenbar nicht mehr ausreichend, um eine Hybridisierung der *Mismatch*-Sonde zu unterbinden. Die Differenzierung ließe sich möglicherweise durch eine Reduktion der Sondenlängen verbessern. Da hierbei aber gleichzeitig die Schmelztemperatur der Sonden sinken würde, wäre diese Modifikation auch mit einer verminderten Sensitivität der Sonden verbunden.

Die Lokalisation des Integrationsortes der mobilen genetischen Elemente ISAb1 und IS1133 war in 68 Fällen erfolgreich. Lediglich in 7 Fällen konnte der

## Diskussion

Integrationsort nicht detektiert werden. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings, dass in anderen Isolaten mehrere Kopien eines mobilen genetischen Elements vorlagen, von denen sich jeweils nur eines an einer detektierbaren Position befand. Auch beim Nachweis verschiedener mobiler genetischer Elemente in einem Isolat bei gleichzeitig mehreren positiven Signalen für Integrationsorte ist eine Zuordnung, welches der Elemente an welcher Position sitzt, nicht möglich. Unter klinischen Gesichtspunkten ist eine solche Zuordnung zwar nicht von Relevanz, da beide Elemente die Expression assoziierter Resistenzgene in gleicher Weise beeinflussen, unter epidemiologischen Gesichtspunkten könnte dies aber von Interesse sein. Aufklären ließe sich der Integrationsort verschiedener mobiler genetischer Elemente, wenn der in einem Element gelegene Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert würde, dessen Emissionsspektrum von dem des Cy3 abweicht, während der Primer in dem anderen Element unmarkiert verblieb. Auf den Integrationsort-spezifischen Sonden ließe sich somit differenzieren welches Target gebunden vorliegt.

### 5.3 Interpretation der statistischen Daten

Ein Wert für die Spezifität des Microarrays hinsichtlich des Nachweises von Resistenzdeterminanten wurde nicht ermittelt. Hierfür wäre die Überprüfung jedes einzelnen Resultats des Arrays mittels einer alternativen Detektionsmethode notwendig. Die stichprobenhafte Nachtestung einzelner Resultate, die Ergebnisse der Positivkontrollen und ein Abgleich der Arrayergebnisse mit denen des NRZ bezüglich Carbapenemasen indizierten eine Spezifität von 100%. Die in Tabelle 14 angegebene Spezifität von 93,7% bezieht sich auf die korrekte Vorhersage des Phänotyps auf Basis des Genotyps. Der geringere Wert ist auf nicht eindeutige Resistenzprofile einzelner Resistenzdeterminanten wie z.B. *bla<sub>GES</sub>*, *aac(6)-Ib*, oder *bla<sub>TEM</sub>* zurückzuführen oder auch auf eine fehlerhafte phänotypische Resistenzbestimmung, wie sie beispielsweise im Fall der Amikacin-Resistenztestung *armA*-positiver Isolate hoch wahrscheinlich ist.

Die Sensitivität des Arrays hinsichtlich der Vorhersage eines Phänotyps wurde mit 99,5% berechnet. Die Sensitivität der Detektion von Resistenzdeterminanten könnte allerdings hinter diesem Wert zurückbleiben. Wie schon die Spezifität kann die Sensitivität ohne umfangreiche Analyse aller Isolate mit einer alternativen Detektionsmethode nicht genau bestimmt werden. Die Nachtestung einzelner Resultate des

## Diskussion

Arrays, welche mit Signalstärken knapp unter 1000 *counts* als negativ eingestuft worden waren, zeigte allerdings in wenigen Fällen, dass diese falsch-negativ waren (vgl. Abschnitt 5.1).

Die in Tabelle 14 gelisteten Werte für die Spezifität, Sensitivität, positiven und negativen Vorhersagewerte für die Korrelation von Genotyp und Phänotyp für die einzelnen Antibiotika basieren teilweise auf äußerst geringen Fallzahlen. So fußt beispielsweise die Berechnung der Sensitivität und des positiven Vorhersagewertes für die Tigecyclin-Resistenzdetektion jeweils auf nur zwei Isolaten. Die statistische Aussagekraft dieser Werte ist entsprechend gering.

### 5.4 Epidemiologie

Die Validierung des Arrays mit 60 *Acinetobacter baumannii* Stämmen lieferte nicht nur den Beweis für dessen Funktionalität, sondern auch umfassende epidemiologische Daten zu den in Deutschland vorkommenden Resistenzdeterminanten. Dabei sind Carbapenemasen wahrscheinlich überrepräsentiert. Ursächlich hierfür ist, dass eine vorliegende Carbapenem-Resistenz der häufigste Anlass für deutsche Kliniker ist, eine Übersendung des jeweiligen Stammes an das NRZ zu veranlassen. Die Prävalenz der detektierten Carbapenemasen untereinander könnte allerdings zu einem gewissen Grad die realen Verhältnisse in Deutschland abbilden.

Die häufigste Ursache einer Carbapenem-Resistenz in dem Studienkollektiv waren Gene für Ambler Klasse D Carbapenemasen der *bla<sub>OXA</sub>* Familie. Diese Beobachtung ist im Einklang mit anderen Studien [124]. Ungewöhnlich häufig wurden allerdings auch Gene für Ambler Klasse B Metallo- $\beta$ -Lactamasen detektiert. Die Prävalenz dieser war in *Acinetobacter baumannii* in der Vergangenheit nur sehr gering [73]. Auch die Prävalenz des mobilen Elements ISAb1 war sehr hoch. In dem Studienkollektiv aus 60 Isolaten wurde es 74-mal nachgewiesen. Dies unterstreicht die Rolle des IS-Elements als Vermittler genetischer Plastizität [125] und bestätigt seine Funktion als Indikator für einen potentiell multiresistenten Phänotyp von *A. baumannii*.

## 5.5 Microarraytechnologie in der Diagnostik

Seit vielen Jahren werden Microarrays dank ihrer Vorzüge erfolgreich in der Forschung und stellenweise in der Diagnostik eingesetzt. Ein grundsätzlicher Nachteil der Microarraytechnologie ist jedoch die geschlossene Konzeption des Nachweises. Relevante Targets müssen *a priori* bekannt und sequenziert sein, um detektiert werden zu können. Entsprechend ist jeder Microarray limitiert auf die Targets die zum Zeitpunkt seiner Entwicklung bekannt waren. Im Fall des in dieser Arbeit entwickelten Microarrays wurden noch bis zum August 2012 entdeckte Resistenzdeterminanten zu den Targets des Arrays aufgenommen. Resistenzrelevante Gene, die nach diesem Zeitpunkt identifiziert wurden, konnten nicht mehr berücksichtigt werden. Um auch neu beschriebene Resistenzdeterminanten nachweisen zu können ist es notwendig den Microarray regelmäßig dem aktuellen Kenntnisstand anzupassen.

Ein weiterer Nachteil der Microarraytechnologie für den Nachweis von bakteriellen Resistenzen ist der, im Vergleich zu kulturbasierten Verfahren, hohe Preis und Arbeitsaufwand. Das hat zur Folge, dass Microarrays im klinischen Umfeld in der Regel nicht routinemäßig eingesetzt werden und ihre Anwendung auf die Diagnose kritisch erkrankter Patienten beschränkt ist. Bei der Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen gibt es bereits heute nur wenige Alternativen zu Microarrays.

Ebenfalls zur Detektion bakterieller Resistenzdeterminanten kommt das *next generation sequencing* (NGS) zur Anwendung, welches die vollständige Sequenzierung eines Isolats im Zeitraum einiger Stunden bis zu wenigen Tagen ermöglicht. Die noch höheren Kosten und der noch größere Zeitaufwand, der pro Analyse veranschlagt werden muss, macht die NGS-Technologie für den Einsatz in der Routinediagnostik jedoch bisher ungeeignet und limitiert ihren Einsatz in der epidemiologischen Überwachung [126].

Die Detektion von Resistenzfaktoren mittels MALDI-TOF-Analyse wurde in den letzten Jahren ebenfalls realisiert. Die Analyse ist binnen weniger Minuten möglich und erfordert beinahe keine Verbrauchsmaterialien, allerdings ist die Anzahl detektierbarer Faktoren äußerst begrenzt [127, 128].

Der relativ hohe Arbeitsaufwand, der mit dem Einsatz der Microarraytechnologie in der Routinediagnostik assoziiert ist, lässt sich zum Teil durch den Einsatz automatisierter Systeme kompensieren. So wurden in den letzten Jahren z.B. von der *Curetis AG* sogenannte *Lab-on-a-Chip*-Systeme (LOC) entwickelt. Bei dieser

## Diskussion

Technik werden alle relevanten Arbeitsschritte robotisch in einer einmalig nutzbaren Kassette ausgeführt [129]. So könnte die Microarraytechnologie auch in der Routinediagnostik eine breitere Anwendung finden. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Analyse eines Isolats ist mit seiner relativ geringen Anzahl an Arbeitsschritten prinzipiell gut für eine Automatisierung geeignet. Zwischenschritte, wie zum Beispiel eine Aufreinigung oder Fragmentierung der PCR-Produkte vor der Hybridisierung, sind, anders als in manch anderen Protokollen, nicht notwendig.

### 5.6 Vergleich mit bestehenden Microarray-Systemen

Ein Microarray zur expliziten Analyse von *Acinetobacter baumannii* Isolaten auf DNA-Ebene wurde bislang nicht beschrieben. 2010 wurde allerdings ein Microarray entwickelt, der dazu in der Lage ist, das Expressionslevel von 47 Effluxpumpen von *A. baumannii* zu bestimmen. Zusätzlich kann mittels dieses Microarrays die Expression von 55 in gramnegativen Bakterien häufig vorkommenden Resistenzgenen nachgewiesen werden [130]. Dieser Array liefert damit detailliertere Informationen über die Efflux-Systeme von *A. baumannii* als der in dieser Arbeit entwickelte DNA-Microarray. Die Sonden zur Detektion aller anderen Targets wurden allerdings nicht für die spezifische Analyse von *A. baumannii* ausgelegt. Einige Resistenzgene, die für diese Spezies spezifisch sind, können damit nicht nachgewiesen werden. Auch Gene, die nicht oder kaum exprimiert werden, können mittels dieses Microarrays nicht nachgewiesen werden. So schlug beispielsweise in einem Test des Arrays die Detektion von 14 Genen der Resistenzinsel des Stammes *A. baumannii* AYE fehl.

Ein DNA-Microarray mit dem Potential zur Analyse von *A. baumannii* Isolaten auf DNA-Ebene wurde 2012 entwickelt. Dieser ist zur Detektion von Resistenzdeterminanten in diversen gramnegativen Bakterien, einschließlich *A. baumannii* ausgelegt [61]. Der Fokus dieses Microarrays liegt allerdings auf einer Charakterisierung einer möglichst großen Anzahl verschiedener Spezies. Damit ist die Analyse einer einzelnen Spezies nicht bis in die Tiefe möglich. So erlaubt seine Sondenausstattung den Nachweis von Resistenzdeterminanten, deren Vorkommen auf die Spezies *A. baumannii* beschränkt ist, in nur sehr eingeschränktem Maße.

Der in dieser Arbeit entwickelte Microarray stellt den ersten umfassenden Array zur spezifischen Detektion von Resistenzdeterminanten im Genom von *A. baumannii* dar.

## 5.7 Theorie zum Hybridisierungsmechanismus

Die ersten Microarrays wurden schon in den 90er-Jahren eingesetzt und seitdem hat sich die zugrundeliegende Technologie stetig weiterentwickelt. Heute ist sie eine Standardmethode im biotechnologischen und medizinischen Bereich mit den verschiedensten Anwendungen. Alle diese basieren auf der Hybridisierung von Proben-DNA mit immobilisierten Sonden, an welchen daraufhin ein Signal detektiert werden kann. Der zugrundeliegende Hybridisierungsmechanismus ist jedoch trotz der intensiven Nutzung dieser Technologie noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Interpretation der generierten Daten erfolgt daher weitgehend nach empirischen, statistischen Methoden [131, 132].

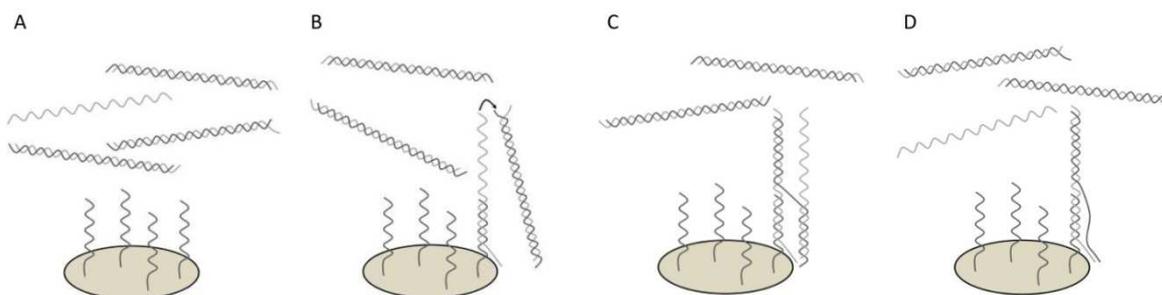
In vielen Anwendungen muss die Proben-DNA vor der Arrayanalyse in einer PCR vervielfältigt werden. In dieser werden die nachzuweisenden DNA-Abschnitte amplifiziert und häufig auch markiert. Der Hybridisierungsmechanismus dieser PCR-Produkte an Microarray-Sonden ist bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt worden. Ein Großteil der in der PCR gebildeten DNA liegt als Doppelstrang vor, so dass deren Basen für eine Hybridisierung an eine Sonde nicht zur Verfügung stehen. Die Ausbildung einer DNA-Triplex aus doppelsträngigem PCR-Produkt und Sonde ist unter den gegebenen Bedingungen äußerst unwahrscheinlich. Die Affinität der Sonde zu dem Doppelstrang wäre sehr gering und nur möglich bei geringem pH-Wert und einem hohen Anteil an Purinbasen in der Zielsequenz [133]. Der wahrscheinlichste Mechanismus für die Hybridisierung doppelsträngiger DNA an eine Sonde ist, dass wenige Basen der Sonde lokal einen Strang aus der Doppelhelix verdrängen. Nach dieser ersten Bindung der Sonde mit wenigen Basen kann sich diese nach dem Reißverschluss-Prinzip Base für Base mehr an ihren komplementären Strang binden und dessen ursprünglichen Bindungspartner konsekutiv verdrängen. Dieser Prozess ist reversibel und insbesondere wenn die Sonde nicht vollständig komplementär zu dem gebundenen Strang ist, ist eine Ablösung der Sonde wahrscheinlich [134]. Während die Verdrängung des ursprünglich gebundenen Stranges durch die Sonde nach dem Reißverschluss-Prinzip auch ohne Katalysator oder ein signifikantes Maß an Aktivierungsenergie ablaufen kann, so ist die initiale Hybridisierung der ersten Basen der Sonde problematisch [135]. Die Rate der spontanen Strang-Separation inmitten eines PCR-Produkts, die zur Ausbildung einer initialen Hybridisierung notwendig wäre, ist unter den typisch genutzten Hybridisierungsbedingungen äußerst gering [134, 135]. Der

## Diskussion

theoretische Hintergrund der Hybridisierungsreaktion von Sonde und doppelsträngiger DNA bleibt damit unklar. Bedingt hierdurch lassen sich auch experimentelle Daten nur ungenügend erklären und einige beobachtbare Phänomene werfen Fragen auf. Beispielsweise ist das selektive Hybridisierungsverhalten von PCR-Produkten an die Sense- oder Antisense-Konformation von Sonden in der Literatur schon häufiger beschrieben worden. Als potentielle Ursache wurden in diesen Fällen die Sekundärstruktur der Proben-DNA oder sterische Hinderung ausgemacht [122, 136]. Die Tatsache, dass sich diese Bindepräferenz bei veränderter Primerkonzentration umkehren kann, spricht jedoch gegen einen signifikanten Einfluss dieser beiden Faktoren. Eine Änderung der Primerkonzentration hat keinerlei Einfluss auf die Struktur des gebildeten PCR-Produkts.

### 5.7.1 Entwicklung eines neuen Hybridisierungsmodells

Es wurde ein Modell für den Hybridisierungsmechanismus entwickelt, das dazu in der Lage ist, eine Erklärung für die experimentellen Daten zu liefern. Grundlage dieses Modells ist, dass die Hybridisierung von PCR-Produkt an Sonden der Katalyse durch einzelsträngige DNA bedarf. Ein potentieller Reaktionsmechanismus ist schematisch in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Modell der Einzelstrang-katalysierten Hybridisierung doppelsträngiger DNA an eine Sonde.** In dem gezeigten Beispiel liegt ein Überschuss an Sense-Strang (hellgrau) vor, der die Hybridisierung an die Antisense-Sonde (dunkelgrau) katalysiert. A: Gezeigt ist der Ausgangszustand an dem Spot der Antisense-Sonde direkt nach Zugabe von Probenmaterial auf den Microarray. Die Proben-DNA, welche einen Überschuss an Sense-Strang besitzt, befindet sich in Lösung über dem Sondenspot. B: Die freien einzelsträngigen Sense-Stränge hybridisierten zunächst an die Antisense-Sonden. Das überhängende Ende dieser Einzelstränge kann dann wiederum als Sonde fungieren. C: Diese sekundäre Sonde kann mit dem antisense-Strang der dsDNA in Lösung hybridisieren und dessen Sense-Gegenstrang damit freisetzen. D: Mit dem freigesetzten Sense-Strang wird der Katalysator der Reaktion regeneriert, so dass weitere Doppelstränge gebunden werden können.

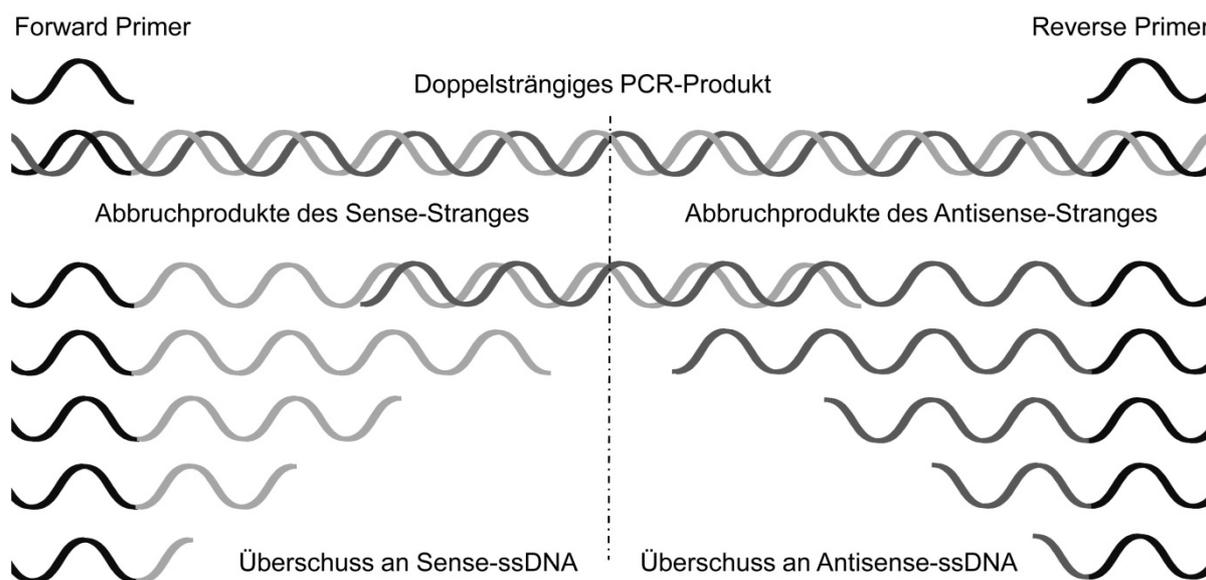
## Diskussion

Wie in Abschnitt 5.7 beschrieben, ist eine spontane direkte Hybridisierung eines Doppelstranges an eine Sonde sehr unwahrscheinlich [134]. Die Hybridisierung von in Lösung befindlicher Einzelstränge an ihre entsprechende Sonde erfolgt dagegen mit sehr hoher Effizienz (vgl. Abschnitt 4.19.5). Das überhängende Ende dieser Einzelstränge kann wiederum als Sonde fungieren [137]. Diese sekundäre Sonde besitzt gegenüber der ursprünglichen kovalent gebundenen Sonde zwei Vorteile, die es ihr erlauben mit der doppelsträngigen DNA in Lösung zu interagieren. Zum einen ist sie meist erheblich länger und die Bindung, die sie eingehen kann, damit auch stabiler. Zum anderen kann sie die ungebundenen Doppelstränge an deren Enden attackieren. Unter typischen Hybridisierungsbedingungen ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Doppelstrang an dessen Ende kurzzeitig aufschmilzt, erheblich höher, als dass dies in seiner Mitte geschieht. Das zeitweise denaturierte Ende des Doppelstranges bietet damit einen Angriffsort für die sekundäre Sonde, so dass diese auf einer Länge weniger Basen mit ihrem komplementären Strang hybridisieren kann. Nach dem bereits beschriebenen Reißverschlussprinzip kann die Sonde Base für Base die Bindung ausbauen und den ursprünglich gebundenen Partner des Stranges verdrängen. Dieser wird entweder zunächst freigesetzt oder direkt an eine benachbarte Sonde gebunden. Da damit wieder ein Einzelstrang zur Verfügung steht, können konsekutiv weitere Doppelstränge an die Sonden gebunden werden. Da sich bereits gebundene Stränge auch wieder ablösen können, wird sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht einstellen.

Einzelsträngige DNA (ssDNA) ist ein meist nicht beachtetes Nebenprodukt jeder PCR und somit auch Bestandteil jeder Hybridisierung in die PCR-Produkt eingesetzt wird, sofern die ssDNA nicht gesondert entfernt wird. Die gesamte ssDNA, die in einer PCR gebildet wird, besteht zum einen aus Abbruchprodukten, die entstehen wenn die Polymerase während der Elongation von ihrem Template abfällt, zum anderen aus Vollängenprodukten. Einzelsträngige Vollängenprodukte können in einem Ansatz nur entweder vom Sense- oder dem Antisense-Strang gleichzeitig vorliegen, da sie bei gleichzeitigem Auftreten miteinander hybridisieren würden. Folglich liegt nur derjenige Strang als Einzelstrang vor, der in der PCR in größerer Menge gebildet wurde. Liegt der Sense-Strang im Überschuss vor katalysiert dieser gemäß dem entwickelten Modell die Hybridisierung an die Antisense-Sonde, liegt der Antisense-Strang im Überschuss vor katalysiert dieser die Bindung an die Sense-Sonde. Unter der Prämisse, dass die Hybridisierung von PCR-Produkt an Sonden

## Diskussion

der Katalyse durch einzelsträngige DNA bedarf, liefert diese Tatsache eine Erklärung dafür, dass nur entweder die Sense- oder Antisense-Konfiguration ein Signal zeigt. Mit dem entwickelten Modell lässt sich auch begründen, warum Sonden, die in der Nähe des Forward-Primers lokalisiert sind, in der Regel ein sehr niedriges S/AS-Verhältnis aufweisen bzw. solche in der Nähe des Reverse-Primers ein sehr hohes. Ursache hierfür können die einzelsträngigen Abbruchprodukte sein, die ebenfalls in jeder PCR entstehen. Wie in dem in Abbildung 28 gezeigten Schema deutlich wird können Abbruchprodukte des Sense-Stranges abhängig von ihrer Länge nur an Sonden in Forward-Primernähe hybridisieren. Abbruchprodukte des Antisense-Strangs können dagegen lediglich an Sonden in Reverse-Primernähe hybridisieren. Je nachdem in welchem Bereich eine Sonde positioniert ist, liegt lokal ein Überschuss an Sense- oder Antisense-Strang vor und bestimmt deren S/AS-Verhältnis. Gemäß dieser Theorie spiegeln die in Abbildung 22 A gezeigten, realen Sondensignale genau die Verteilung der in Abbildung 28 gezeigten Stränge wider.



**Abbildung 28:** Darstellung eines doppelsträngigen Vollängenprodukts und der Verteilung von Abbruchprodukten des Sense- und Antisense-Stranges. Durch diese ergibt sich ein Überschuss an Sense-ssDNA nahe der Bindestelle des Forward-Primers und ein Überschuss an Antisense-ssDNA nahe der Bindestelle des Reverse-Primers. Gemäß dem entwickelten Modell wird sich, abhängig von der Position einer Sonde, deren S/AS-Verhältnis nach dem lokal vorliegenden Verhältnis an ssDNA richten.

## Diskussion

Es wurde beobachtet, dass eine veränderte Primerkonzentration in der PCR dazu führen kann, dass sich das Hybridisierungsverhalten des entstehenden Produkts umkehrt. Da die Primerkonzentration direkt die Ausbeute von Sense- und Antisense-Strang und damit auch deren Verhältnis beeinflusst, ist dieser Effekt gemäß dem entwickelten Modell plausibel. Warum eine Verringerung der Konzentration beider Primer – Forward und Reverse – dazu führt, dass ein Strang bevorzugt gebildet wird, konnte nicht mit Gewissheit aufgeklärt werden. Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass die Konzentration der vom Hersteller bezogenen Primer-Stammlösung häufig um bis zu 10% vom Nennwert abweicht. Damit ist es möglich, dass es sich bei der PCR um eine asymmetrische handelte, mit Unterschieden in der Primerkonzentration von Forward- und Reverse-Primer von bis zu 20%. Wie in Abschnitt 4.19.3 dargestellt, ist diese Differenz nicht relevant, wenn die Primer im Überschuss eingesetzt werden. Wird die Primerkonzentration jedoch stark reduziert, so wird der geringer konzentrierte Primer im Laufe der Reaktion zum limitierenden Faktor, was mit einer verminderten Produktion des betroffenen Stranges verbunden ist. Damit entsteht ein Überschuss an Vollängenprodukt des anderen Stranges der alle Sonden, ungeachtet ihrer Position, in gleicher Weise beeinflussen kann. Dies würde das uniforme Verhalten der Sonden bei geringen Primerkonzentrationen (vgl. Abbildung 22 D) erklären.

Das Modell lieferte somit für sämtliche bei den Hybridisierungen aufgetretenen Effekte eine potentielle Ursache. So kann z.B. erklärt werden, wie ein doppelsträngiges PCR-Produkt an eine Sonde hybridisieren kann, warum meist nur Sense- oder Antisense-Sonde ein Signal liefert, wie die Position einer Sonde deren S/AS-Verhältnis beeinflusst und warum dieses Verhältnis bei veränderten Primerkonzentrationen erheblich schwanken kann.

In den durchgeführten Experimenten konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass einzelsträngige DNA die Hybridisierung von PCR-Produkt an Microarraysonden massiv beeinflusst. Ob dies gemäß dem entwickelten Modell für den Reaktionsmechanismus erfolgte konnte nicht mit Gewissheit festgestellt werden, die Daten der einzelnen Hybridisierungen können jedoch Widerspruchsfrei erklärt werden. So deuteten beispielsweise die Versuche mit einer asymmetrischen PCR darauf hin, dass Unterschiede in der Konzentration von Forward- und Reverse-Primer für die UKS verantwortlich sind.

## Diskussion

Auch das Verhalten der Sonden bei Zusatz von synthetischem Sense-Einzelstrang ist konform mit dem Modell. In diesen Experimenten hatte der damit erzeugte Überschuss an Sense-Einzelstrang in der Reaktion dazu geführt, dass das Signal auf den Sense-Sonden stark reduziert wurde bzw. das der Antisense-Sonden stark zunahm. Gemäß dem Modell wurden einerseits die im PCR-Ansatz enthaltenen Antisense-Einzelstränge gebunden und konnten damit nicht mehr an die Sense-Sonden binden. Zum anderen konnte der synthetische Sense-Einzelstrang an die Antisense-Sonden hybridisieren und dort die Bindung von doppelsträngigem PCR-Produkt katalysieren. Da der synthetische Einzelstrang nicht markiert war, konnte dieser an sich keinerlei Signal auf den Sonden erzeugen. Jegliche beobachtbaren Effekte basierten folglich auf dessen Wirkung auf das markierte PCR-Produkt.

Denkbar wäre auch, dass der synthetische Einzelstrang bereits in Lösung den markierten Sense-Strang des PCR-Produktes verdrängen könnte, so dass markierter Einzelstrang freigesetzt würde. Dieser hätte dann für das Signal auf den Antisense-Sonden verantwortlich sein können. Dass die in Abbildung 25 gezeigte Signalverteilung aber nur durch diese freigesetzten Einzelstränge verursacht wurde, kann ausgeschlossen werden. Die Wiederholung des Experiments mit ausschließlich markiertem Antisense-Strang machte deutlich, dass bei dem Versuch auch Antisense-Strang an Antisense-Sonden gebunden vorlag. Diese Bindung konnte nur eine indirekte sein, die durch den Sense-Strang als Bindeglied vermittelt wurde.

Das entwickelte Modell setzt voraus, dass einzelsträngige DNA erheblich effizienter an Sonden hybridisiert als doppelsträngige DNA bzw. PCR-Produkt. Die experimentelle Beweisführung dieser Annahme bzw. eine Quantifizierung der Hybridisierungsgeschwindigkeit wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (OPRS) erbracht.

### **5.7.2 Aspekte des entwickelten Modells in gegenwärtiger Literatur**

Die besseren Hybridisierungseigenschaften von ssDNA im Vergleich zu PCR-Produkt wurden bereits in der Literatur beschrieben, so wurde beispielsweise durch den Einsatz einer asymmetrischen PCR der Anteil an gebildetem Einzelstrang erhöht und mit diesem auch das Signal der entsprechenden Sonde [138]. Die Wirkung der ssDNA auf dsDNA wurde dabei allerdings nicht erkannt.

Die in dem entwickelten Modell beschriebenen hypothetischen Mechanismen wurden in Teilschritten bereits in der Literatur beschrieben: so zum Beispiel der

## Diskussion

Strangaustausch nach dem Reißverschlussprinzip oder die Fähigkeit an eine Sonde gebundenen Einzelstranges wiederum als Sonde zu fungieren. Auch wurden bereits Agglomerate aus mehreren Sense- und Antisense-Strängen an einer einzigen Sonde beschrieben [139]. Diese Komplexe aus sogenannter *branchched* DNA (bDNA) werden gebildet aus mehreren jeweils partiell miteinander hybridisierten Strängen. Der in dem Modell beschriebene Komplex aus den drei Komponenten Sonde, Sense- und Antisense-Strang stellt eine kleine Einheit bDNA dar. Eine weitere Verzweigung des gebundenen Doppelstranges, was zu einem größeren an die Sonde gebundenen Komplex aus Sense- und Antisense-Strängen führen würde, ist möglich.

### 5.7.3 Anwendungen des entwickelten Modells

Die gewonnenen Erkenntnisse führen zu einem tieferen Verständnis des Hybridisierungsmechanismus mit unmittelbaren praktischen Anwendungen. So können zum Beispiel gegenwärtige mathematische Modelle, die den Einfluss einzelsträngiger DNA auf den Hybridisierungsprozess nicht berücksichtigen [140, 141] angepasst werden, um die vorliegende DNA-Konzentration exakter zu berechnen. Auch ist es vorstellbar durch den gezielten Einsatz von ssDNA die Hybridisierung auf die Sense- oder Antisense-Sonde zu dirigieren. Damit würde die jeweils andere Sondenkonformation überflüssig, was bei der Produktion von Microarrays Aufwand und Kosten reduzieren könnte.

Es ist derzeit gängige Praxis in der Microarrayentwicklung von einer Sonde jeweils die Sondenkonformation auf dem Array zu eliminieren, welche sich experimentell als weniger sensitiv dargestellt hat. Dies erweist sich jedoch dann als problematisch, wenn das Protokoll der Analyse umgestellt wird, insbesondere wenn die Primerkonzentration verändert wird, aber auch wenn dem System im Zuge eines Updates weitere Targets zugefügt werden und damit die Komplexität der PCR zunimmt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde kann dies zu einer UKS einiger Sonden führen. Wenn von diesen Sonden die entsprechende Konformation auf dem Array bereits eliminiert worden ist, kann das entsprechende Target nicht mehr nachgewiesen werden. Wie ebenfalls gezeigt wurde, können auch schon Schwankungen in der Primerkonzentration von 10% zu einer UKS führen, so dass dies auch schon bei Nutzung einer anderen Primercharge vorkommen kann. Das Risiko des Auftretens einer UKS besteht besonders bei Sonden mit einem S/AS-Verhältnis der Größenordnung 1 ( $0,1 < S/AS < 10$ ). Bei Sonden dieser Gruppe sollte auf die Eliminierung der schwächeren Sondenkonformation verzichtet werden.

## Diskussion

Auch die absolute Signalstärke von Sonden mit einem S/AS-Verhältnis der Größenordnung 1 ist in der Regel relativ gering. Dies kann entweder durch die Amplifikation des entsprechenden Targets in einer asymmetrischen PCR kompensiert werden oder durch eine Re-Positionierung der Sonde. War das S/AS-Verhältnis  $>1$  ist eine Verschiebung in Richtung der Position des Reverse-Primers sinnvoll, bei einem S/AS-Verhältnis  $<1$  entgegengesetzt. Diese Modifikationen zielen darauf ab das Signal der stärkeren Sondenkonformation weiter zu erhöhen. Gleichzeitig wird damit der Wert des Logarithmus des S/AS-Verhältnisses erhöht und eine UKS dieser Sonde konsekutiv unwahrscheinlicher.

## 5.8 Ausblick

Der entwickelte Microarray ist in seiner validierten Form funktional und kann zur Charakterisierung von *A. baumannii* Isolaten herangezogen werden. Im Laufe der Validierungsphase zeigten sich dennoch Aspekte mit dem Potential zur Optimierung des Systems.

Zum einen können weitere Targets aufgenommen werden, um den Informationsgehalt jeder einzelnen Analyse zu erhöhen. Potentielle Targets wären eine Subtypisierung von *aac(6)-Ib*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* und *bla<sub>GES</sub>*, die Detektion weiterer IS-Elemente, wie z.B. IS<sub>Aba2</sub>, 3, 4 und 9 und weitere Integrationsorte dieser, wie beispielsweise innerhalb des *carO* Gens.

Vereinzelt konnten während der Validierung Sondensignale knapp unter 1000 counts beobachtet werden, die nach gesonderter Überprüfung als falsch-negativ bewertet werden mussten. Um die Sensitivität des Arrays zu steigern, könnten diese Primer- und Sondensysteme individuell überarbeitet werden. Neuartige Möglichkeiten zur Optimierung des Nachweises einzelner Targets wurden in Abschnitt 5.7.3 dieser Arbeit vorgestellt.

Das entwickelte Protokoll für die Microarrayanalyse wurde im Hinblick auf maximale Sensitivität und Spezifität optimiert, nicht jedoch hinsichtlich des Zeitbedarfs. Sowohl der Hybridisierungs- als auch der Multiplex-PCR-Arbeitsschritt können potentiell verkürzt werden, ohne dass Einbußen in der Qualität der gesamten Analyse zu erwarten wären. Eine solche Verkürzung der Analysendauer wäre insbesondere für die klinische Anwendung vorteilhaft. Bei der Therapie kritisch erkrankter Patienten trägt eine schnellere Diagnostik maßgeblich zur Verbesserung der Prognose bei.

Diskussion

Auch eine Automatisierung des Protokolls, wie in Abschnitt 5.5 beschrieben, wäre aus ökonomischer Sicht hierfür wünschenswert.

Das entwickelte Modell für den Hybridisierungsmechanismus von PCR-Produkten an Sonden konnte in seiner Kernaussage auf seine Richtigkeit hin überprüft werden, bedarf allerdings weiterer experimenteller Validierung. Insbesondere der Mechanismus der ssDNA-Katalyse ist bislang lediglich theoretischer Natur und erfordert eine eingehendere Untersuchung.

## 6. Publikationen

Die Entwicklung des Microarrays sowie die Ergebnisse der Validierung wurden im Juli 2013 im Journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* unter dem Titel „*DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in Acinetobacter baumannii clinical isolates*“ veröffentlicht (PMID: 23856783) [142].

Die Ergebnisse der Untersuchung des Hybridisierungsmechanismus und das daraus abgeleitete Modell wurden im Dezember 2013 unter dem Titel „*A novel model for the hybridization mechanism of PCR-products to microarray capture probes*“ zur Publikation bei dem Journal *Nucleic Acids Research* eingereicht.

## 7. Danksagung

Ich danke Herr Prof. Dr. C. Knabbe herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und seine stete Unterstützung meiner Forschung, auch über die Grenzen der ursprünglichen Zielsetzung meiner Dissertation hinaus. Außerdem bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, am Robert Bosch-Krankenhaus bzw. dem Herz- und Diabeteszentrum NRW zu promovieren.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herr PD Dr. S. Rupp für die Bereitschaft meine Arbeit von Seiten der Universität Stuttgart bzw. dem Fraunhofer IGB zu betreuen. Mit seinem Fachwissen stand er mir stets zur Seite und hat mein Forschungsprojekt durch seine Anregungen und konstruktive Kritik bereichert. Auch seine Unterstützung in organisatorischen Belangen war für mich äußerst wertvoll.

Ich danke Herr Prof. Dr. P. Scheurich vielmals für die prompte Bereitschaft meine Arbeit seitens der Universität Stuttgart zu begutachten.

Mein Dank gilt auch Herr Prof. Dr. T. Hirth für die Möglichkeit, während meiner Dissertation auf die Ressourcen des Fraunhofer IGB zugreifen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herr Dr. J. Weile für die umfangreiche Unterstützung in allen Belangen über die ganze Dauer meiner Arbeit. Ohne seine Hilfe wäre mein Dissertationsvorhaben bereits in einem frühen Stadium gescheitert. Insbesondere danke ich für die Unterstützung bei der Veröffentlichung meiner Ergebnisse, einschließlich dieser Dissertation.

Ich danke auch Dr. K. Lemuth, PD Dr. S. Bailer und Dr. S. Hartmann, die mich während meines Studiums und der Zeit als Doktorand als Anleiter betreut haben.

Mein Dank gilt meinen Kollegen am Herz- und Diabeteszentrum NRW, am Institut für klinische Pharmakologie bzw. dem Robert-Bosch-Krankenhaus und am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, insbesondere der Arbeitsgruppe Infektionsbiologie und Arraytechnologie. Die gute Arbeitsatmosphäre trug wesentlich dazu bei, dass ich mich stets mit Freude an meine Zeit als Doktorand zurückerinnern werde.

Ich danke auch meiner Familie, die mir über die Dauer meines Studiums stets den Rücken gestärkt und dieses damit erst ermöglicht hat.

Danksagung

Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch das 7. EU-Forschungsrahmenprogramm (FP7/2007-2013) gemäß Finanzhilfvereinbarung Nr. 241446 (Projekt „ANTIRESDEV“) und unterstützt durch das Fraunhofer IGB.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Vincent, J.L., et al., *The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee.* JAMA, 1995. **274**(8): p. 639-44.
2. Daschner, F., H. Rüdén, and M. Rotter, *Kostendämpfung durch Krankenhaushygiene.* Dtsch Arztebl International, 1989. **86**(6): p. 324-7.
3. Gastmeier, P. and C. Geffers, *Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich.* Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**: p. 1111-1115.
4. Gastmeier, P., et al., *Letalität auf deutschen Intensivstationen: Mit oder wegen nosokomialer Infektion?* Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2005. **40**(05): p. 267-272.
5. Armstrong, G.L., L.A. Conn, and R.W. Pinner, *Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century.* JAMA, 1999. **281**(1): p. 61-6.
6. Kerwat, K., et al., *Resistance to antibiotics and multiresistant pathogens].* Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS, 2010. **45**(4): p. 242.
7. Oyston, P.C., et al., *Novel peptide therapeutics for treatment of infections.* Journal of medical microbiology, 2009. **58**(8): p. 977-987.
8. Pitout, J.D. and K.B. Laupland, *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern.* Lancet Infect Dis, 2008. **8**(3): p. 159-66.
9. Pournaras, S., et al. *Advances in antibacterial therapy against emerging bacterial pathogens.* in *Seminars in hematology.* 2009. Elsevier.
10. Cao, B., et al., *Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections.* Journal of Hospital Infection, 2004. **57**(2): p. 112-118.
11. Elemam, A., J. Rahimian, and W. Mandell, *Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature.* Clinical infectious diseases, 2009. **49**(2): p. 271-274.
12. Fournier, P.-E., et al., *Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.* PLoS genetics, 2006. **2**(1): p. e7.
13. Chastre, J., *Evolving problems with resistant pathogens.* Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**: p. 3-14.
14. Bergogne-Berezin, E. and K. Towner, **Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.* Clinical Microbiology Reviews, 1996. **9**(2): p. 148.
15. Nemec, A., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU).* Research in microbiology, 2011. **162**(4): p. 393-404.

## Literaturverzeichnis

16. Chastre, J. and J.-L. Trouillet. *Problem pathogens (Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter)*. in *Seminars in respiratory infections*. 2000.
17. Villers, D., et al., *Nosocomial Acinetobacter baumannii infections: microbiological and clinical epidemiology*. *Annals of internal medicine*, 1998. **129**(3): p. 182.
18. Afzal-Shah, M. and D. Livermore, *Worldwide emergence of carbapenem-resistant Acinetobacter spp.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998. **41**(5): p. 576-577.
19. Hu, J. and J.L. Robinson, *Systematic review of invasive Acinetobacter infections in children*. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2010. **21**(2): p. 83.
20. Tomasz, A., *Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria--a report on the Rockefeller University workshop*. *New England journal of medicine*, 1994. **330**(17): p. 1247-1251.
21. Bouvet, P.J. and P.A. Grimont, *Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and emended descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii*. *International journal of systematic bacteriology*, 1986. **36**(2): p. 228-240.
22. Dijkshoorn, L., A. Nemec, and H. Seifert, *An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews microbiology*, 2007. **5**(12): p. 939-951.
23. Linde, H.-J., et al., *Septicemia due to Acinetobacter junii*. *Journal of clinical microbiology*, 2002. **40**(7): p. 2696-2697.
24. Fournier, P.E., H. Richet, and R.A. Weinstein, *The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities*. *Clinical infectious diseases*, 2006. **42**(5): p. 692-699.
25. Taccone, F., et al., *Successful treatment of septic shock due to pan-resistant Acinetobacter baumannii using combined antimicrobial therapy including tigecycline*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2006. **25**(4): p. 257-260.
26. Metzgar, D., et al., *Acinetobacter sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering*. *Nucleic acids research*, 2004. **32**(19): p. 5780-5790.
27. Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson, *Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen*. *Clinical microbiology reviews*, 2008. **21**(3): p. 538-582.
28. Doi, Y., et al., *Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii*. *Emerging infectious diseases*, 2009. **15**(6): p. 980.
29. Jawad, A., et al., *Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates*. *Journal of clinical microbiology*, 1998. **36**(7): p. 1938-1941.
30. Livermore, D.M. and N. Woodford, *The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, < i> Pseudomonas</i> and< i> Acinetobacter</i>*. *TRENDS in Microbiology*, 2006. **14**(9): p. 413-420.
31. Dijkshoorn, L., et al., *Prevalence of Acinetobacter baumannii and other Acinetobacter spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals*. *Clin Microbiol Infect*, 2005. **11**(4): p. 329-32.
32. Perez, F., et al., *Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. **51**(10): p. 3471-3484.

## Literaturverzeichnis

33. Kollef, M.H., et al., *Inadequate antimicrobial treatment of infections a risk factor for hospital mortality among critically ill patients*. CHEST Journal, 1999. **115**(2): p. 462-474.
34. Mahgoub, S., J. Ahmed, and A.E. Glatt, *Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii**. American journal of infection control, 2002. **30**(7): p. 386-390.
35. Eliopoulos, G.M., L.L. Maragakis, and T.M. Perl, *Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options*. Clinical infectious diseases, 2008. **46**(8): p. 1254-1263.
36. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **39**(3): p. 309-317.
37. Corbella, X., et al., *Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii**. Clinical infectious diseases, 1996. **23**(2): p. 329-334.
38. Joly-Guillou, M.L., *Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter**. Clinical microbiology and infection, 2005. **11**(11): p. 868-873.
39. Villegas, M.V. and A.I. Hartstein, *Acinetobacter Outbreaks, 1977-2000*. Infection control and hospital epidemiology, 2003. **24**(4): p. 284-295.
40. Hosoglu, S., et al., *Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey*. Infection, 2012. **40**(1): p. 11-18.
41. Obana, Y., *Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice*. Microbiology and immunology, 1986. **30**(7): p. 645.
42. Valles, J., et al., *Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival*. Chest, 2003. **123**(5): p. 1615-24.
43. Luna, C.M., *Blood cultures in community-acquired pneumonia: are we ready to quit?* Chest, 2003. **123**(4): p. 977-8.
44. Fishbain, J. and A.Y. Peleg, *Treatment of *Acinetobacter* infections*. Clinical infectious diseases, 2010. **51**(1): p. 79-84.
45. Hall, B.G. and M. Barlow, *Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **55**(6): p. 1050-1051.
46. Ambler, R., *The Structure of  $\beta$ -Lactamases*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 1980. **289**(1036): p. 321-331.
47. Brown, S. and S. Amyes, *OXA ( $\beta$ )-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(1): p. 1-3.
48. Walther-Rasmussen, J. and N. Høiby, *OXA-type carbapenemases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. **57**(3): p. 373-383.
49. Wachino, J., et al., *Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A  $\beta$ -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 2905-10.

## Literaturverzeichnis

50. Shakil, S., et al., *Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground*. Journal of biomedical science, 2008. **15**(1): p. 5-14.
51. Salipante, S.J. and B.G. Hall, *Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene*. Mol Biol Evol, 2003. **20**(4): p. 653-9.
52. Wisplinghoff, H., et al., *Mutations in gyrA and parC associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of Acinetobacter baumannii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. **51**(1): p. 177-180.
53. Jacoby, G.A., *Mechanisms of resistance to quinolones*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(Supplement 2): p. S120-S126.
54. Zhao, W.S., et al., *Coexistence of blaOXA-23 with armA and novel gyrA mutation in a pandrug-resistant Acinetobacter baumannii isolate from the blood of a patient with haematological disease in China*. J Hosp Infect, 2011. **77**(3): p. 278-9.
55. Tan, T. and S. Ng, *The in-vitro activity of colistin in gram-negative bacteria*. Singapore medical journal, 2006. **47**(7): p. 621.
56. Cai, Y., et al., *Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2012. **67**(7): p. 1607-1615.
57. Lim, L.M., et al., *Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2010. **30**(12): p. 1279-1291.
58. Moffatt, J.H., et al., *Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(6): p. 3022-3024.
59. Park, Y.K., et al., *Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in Acinetobacter baumannii*. International journal of antimicrobial agents, 2011. **37**(6): p. 525-530.
60. Moffatt, J.H., et al., *Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(12): p. 4971-4977.
61. Card, R., et al., *Evaluation of an expanded microarray for detecting antibiotic resistance genes in a broad range of gram-negative bacterial pathogens*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(1): p. 458-65.
62. Weile, J., et al., *DNA microarray for genotyping multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **59**(3): p. 325-38.
63. Strommenger, B., et al., *DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Mol Cell Probes, 2007. **21**(3): p. 161-70.
64. Perreten, V., et al., *Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(5): p. 2291-2302.

## Literaturverzeichnis

65. Leinberger, D.M., et al., *Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(2): p. 460-71.
66. Batchelor, M., et al., *Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **31**(5): p. 440-51.
67. Cuzon, G., et al., *Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM)*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2012. **67**(8): p. 1865-1869.
68. Sint, D., L. Raso, and M. Traugott, *Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success*. Methods in Ecology and Evolution, 2012. **3**(5): p. 898-905.
69. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
70. Letowski, J., R. Brousseau, and L. Masson, *Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **57**(2): p. 269-278.
71. Grimm, V., et al., *Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3766-74.
72. Robledo, I.E., et al., *Detection of KPC in Acinetobacter spp. in Puerto Rico*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(3): p. 1354-1357.
73. Tsakris, A., et al., *VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Acinetobacter baumannii*. Emerging infectious diseases, 2006. **12**(6): p. 981.
74. Tysall, L., et al., *IMP-1 carbapenemase detected in an Acinetobacter clinical isolate from the UK*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. **49**(1): p. 217-218.
75. Ellington, M.J., et al., *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007. **59**(2): p. 321-322.
76. Bonomo, R.A. and D. Szabo, *Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa*. Clinical infectious diseases, 2006. **43**(Supplement 2): p. S49-S56.
77. Naas, T., et al., *Emergence of PER and VEB extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Acinetobacter baumannii in Belgium*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. **58**(1): p. 178-182.
78. Vahaboglu, H., et al., *Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey: a nationwide multicenter study*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997. **41**(10): p. 2265-2269.
79. Castanheira, M., et al., *Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4654-61.

## Literaturverzeichnis

80. Lee, K., et al., *Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2005. **49**(11): p. 4485-4491.
81. Bonnin, R.A., et al., *Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(1): p. 349-54.
82. Pfeifer, Y., et al., *Molecular characterization of blaNDM-1 in an Acinetobacter baumannii strain isolated in Germany in 2007*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011. **66**(9): p. 1998-2001.
83. Rodríguez-Martínez, J.-M., L. Poirel, and P. Nordmann, *Genetic and functional variability of AmpC-type  $\beta$ -lactamases from Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(11): p. 4930-4933.
84. Potron, A., et al., *Genetic and Biochemical Characterization of the First Extended-Spectrum CARB-Type  $\beta$ -Lactamase, RTG-4, from Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(7): p. 3010-3016.
85. Bonnet, R., *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 1-14.
86. Yin, X.-L., et al., *Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance, 2008. **14**(2): p. 145-150.
87. Cho, Y.J., et al., *Genetic basis of resistance to aminoglycosides in Acinetobacter spp. and spread of armA in Acinetobacter baumannii sequence group 1 in Korean hospitals*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2009. **64**(2): p. 185-190.
88. Nemec, A., et al., *Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii clones*. Journal of medical microbiology, 2004. **53**(12): p. 1233-1240.
89. Vila, J., S. Martí, and J. Sánchez-Céspedes, *Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007. **59**(6): p. 1210-1215.
90. Coyne, S., P. Courvalin, and B. Périchon, *Efflux-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(3): p. 947-953.
91. Roca, I., et al., *CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(9): p. 4013-4014.
92. Agersø, Y. and L. Guardabassi, *Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in Acinetobacter spp. of environmental and clinical origin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **55**(4): p. 566-569.
93. Tian, G.-B., et al., *Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in Acinetobacter baumannii: ADC-56 confers resistance to cefepime*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(10): p. 4922-4925.
94. Rodríguez-Martínez, J.-M., et al., *Extended-spectrum cephalosporinase in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(8): p. 3484-3488.

## Literaturverzeichnis

95. Figueiredo, S., et al., *In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in Acinetobacter baumannii related to ISAba1-mediated overexpression of the natural blaOXA-66 oxacillinase gene*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(6): p. 2657-2659.
96. Segal, H., et al., *Extended-10 promoter in ISAba-1 upstream of blaOXA-23 from Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007. **51**(8): p. 3040-3041.
97. Poirel, L. and P. Nordmann, *Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006. **50**(4): p. 1442-1448.
98. Heritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann, *Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in Acinetobacter baumannii*. Clinical microbiology and infection, 2006. **12**(2): p. 123-130.
99. Hujer, K.M., et al., *Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006. **50**(12): p. 4114-4123.
100. Karthikeyan, K., M. Thirunarayan, and P. Krishnan, *Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of Acinetobacter baumannii from India*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **65**(10): p. 2253-2254.
101. Agersø, Y. and A. Petersen, *The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene sulII are common among resistant Acinetobacter spp. isolated from integrated fish farms in Thailand*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007. **59**(1): p. 23-27.
102. Houang, E.T., et al., *Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-β-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in Acinetobacter strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. **47**(4): p. 1382-1390.
103. Schwarz, S., et al., *Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol*. FEMS microbiology reviews, 2004. **28**(5): p. 519-542.
104. Mak, J.K., et al., *Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2009. **63**(1): p. 47-54.
105. Moubareck, C., et al., *GES-11, a novel integron-associated GES variant in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(8): p. 3579-3581.
106. Post, V. and R.M. Hall, *AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(6): p. 2667-2671.
107. Zu-huang, M. and Q. Ling, *Mechanisms of Drug Resistance in Multidrug-resistant Strains of Acinetobacter baumannii [J]*. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008. **7**: p. 003.
108. Touati, A., et al., *First report of qnrB-producing Enterobacter cloacae and qnrA-producing Acinetobacter baumannii recovered from Algerian hospitals*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2008. **60**(3): p. 287-290.

## Literaturverzeichnis

109. YANG, R.-G., et al., *Detection of qnr gene and drug resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii*.
110. Moffatt, J.H., et al., *Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(6): p. 3022-4.
111. Moffatt, J.H., et al., *Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(12): p. 4971-7.
112. Henegariu, O., et al., *Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol*. Biotechniques, 1997. **23**(3): p. 504-511.
113. Fernandez-Cuenca, F., et al., *Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(3): p. 565-74.
114. Ribera, A., et al., *Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and beta-lactams in Acinetobacter genospecies 3*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(4): p. 1430-2.
115. Akers, K.S., et al., *Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1132-8.
116. Jung, S., et al., *False susceptibility to amikacin by VITEK 2 in Acinetobacter baumannii harboring armA*. Ann Clin Lab Sci, 2010. **40**(2): p. 167-71.
117. Vila, J., et al., *Spread of amikacin resistance in Acinetobacter baumannii strains isolated in Spain due to an epidemic strain*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(3): p. 758-61.
118. Hornsey, M., et al., *AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(8): p. 1589-93.
119. Marchand, I., et al., *Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in Acinetobacter baumannii is regulated by the AdeRS two-component system*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(9): p. 3298-304.
120. Sun, J.R., et al., *A truncated AdeS kinase protein generated by ISAbal1 insertion correlates with tigecycline resistance in Acinetobacter baumannii*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49534.
121. Chizhikov, V., et al., *Microarray analysis of microbial virulence factors*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 3258-63.
122. Peplies, J., F.O. Glockner, and R. Amann, *Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(3): p. 1397-407.
123. Hartmann, S.C., *Entwicklung eines DNA-Mikroarrays zur Identifizierung und Resistenzcharakterisierung Sepsis-assoziiierter humanpathogener Mikroorganismen unter Anwendung der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse*. 2013. 1-221.
124. Vahaboglu, H., et al., *High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of Acinetobacter spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(3): p. 537-42.

## Literaturverzeichnis

125. Mugnier, P.D., L. Poirel, and P. Nordmann, *Functional analysis of insertion sequence ISAba1, responsible for genomic plasticity of Acinetobacter baumannii*. Journal of bacteriology, 2009. **191**(7): p. 2414-2418.
126. Roh, S.W., et al., *Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research*. Trends in biotechnology, 2010. **28**(6): p. 291-299.
127. Burckhardt, I. and S. Zimmermann, *Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours*. Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(9): p. 3321-3324.
128. Du, Z., et al., *Identification of Staphylococcus aureus and Determination of Its Methicillin Resistance by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical chemistry, 2002. **74**(21): p. 5487-5491.
129. Reddington, K., et al., *Advances in multiparametric molecular diagnostics technologies for respiratory tract infections*. Current opinion in pulmonary medicine, 2013. **19**(3): p. 298-304.
130. Coyne, S., et al., *Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in Acinetobacter baumannii with a microarray*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010. **54**(1): p. 333-340.
131. Trapp, C., M. Schenkelberger, and A. Ott, *Stability of double-stranded oligonucleotide DNA with a bulged loop: a microarray study*. BMC Biophys, 2011. **4**: p. 20.
132. Pozhitkov, A.E., et al., *Beyond Affymetrix arrays: expanding the set of known hybridization isotherms and observing pre-wash signal intensities*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(5): p. e28.
133. Plum, G.E., et al., *Thermodynamic characterization of the stability and the melting behavior of a DNA triplex: a spectroscopic and calorimetric study*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(23): p. 9436-9440.
134. Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov, *Molecular interactions on microarrays*. Nat Genet, 1999. **21**(1 Suppl): p. 5-9.
135. Altan-Bonnet, G., A. Libchaber, and O. Krichevsky, *Bubble dynamics in double-stranded DNA*. Physical review letters, 2003. **90**(13): p. 138101.
136. Peytavi, R., et al., *Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 89-96.
137. Stedtfeld, R.D., et al., *Influence of dangling ends and surface-proximal tails of targets on probe-target duplex formation in 16S rRNA gene-based diagnostic arrays*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(2): p. 380-9.
138. Zhu, L.-X., et al., *Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007. **51**(10): p. 3707-3713.
139. Kim, K.-T. and C.-B. Chae, *Dramatic increase in the signal and sensitivity of detection via self-assembly of branched DNA*. Molecules and cells, 2011. **32**(4): p. 367-374.
140. Li, S., A. Pozhitkov, and M. Brouwer, *A competitive hybridization model predicts probe signal intensity on high density DNA microarrays*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(20): p. 6585-91.

## Literaturverzeichnis

141. Gharaibeh, R.Z., A.A. Fodor, and C.J. Gibas, *Accurate estimates of microarray target concentration from a simple sequence-independent Langmuir model*. PloS one, 2010. **5**(12): p. e14464.
142. Dally, S., et al., *DNA-Microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in Acinetobacter baumannii clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2013.
143. Hujer, K.M., et al., *Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(12): p. 4114-23.
144. Ruzin, A., D. Keeney, and P.A. Bradford, *AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(5): p. 1001-4.

## 9. Anhang

**Tabelle 16: Auflistung der Targets des entwickelten Microarrays, einschließlich der Akzessionsnummern der Referenz-Sequenzen in der Datenbank *Genbank*. Ebenfalls angegeben ist die Sequenz ihrer jeweiligen Forward- und Reverse-Primer, die Größe des durch diese gebildeten Produkts und in welchem Primerpool es amplifiziert wurde**

Target	Referenz	Primer	Primer-pool	Produkt-größe
<i>aac(3)-Ia</i>	DQ370505	TTTCGGTCGTTGAGTTCCGGAG GCTTGAGGAGATTGATGAGCG	1	257
<i>aac(3)-IIa</i>	EU839488	ATTGGTCCGGTCGAAGGAG TGATTCAGCAGGCCGAACC	2	215
<i>aac(3)-IV</i>	DQ095874	GTCGTGTTGGCATCGTGTC ACGACGAGCCGTTCCGATC	3	256
<i>aac(6')-Iad</i>	AB119105	GCAACTGTCCAAGATCCACC GCCTACAGGACTCGTATTCGTC	1	213
<i>aac(6')-Ib, -31</i>	AY007784	TGGTGGGGCGGAGAAGAA GGGTCCGTTTGGATCTTGG	2	317
<i>aac(6')-Ig, -Ik</i>	L09246	CATCAGAAGCTTCACTCAAAGATTGG CAGTRCAAGAAAATTGTTTTGCCAC	2	312
<i>aac(6')-Ih, -Ij, -Is, -It, -Iu, -Iv, -Iw</i>	L29044	GCTTRCTBTGGCCTGATCATG ACCACRCGTTTCAGTTTCATGAAAACC	2	361
<i>aac(6')-IL</i>	Z54241	GCTGGAATGAATCATGGGGAG CCTACTCTTCGCTCTCGTCTC	2	240
<i>aac(6')-Ir</i>	AF031326	GCTTRCTBTGGCCTGATCATG CACTCGGTTTCTGAAAGCC	2	355
<i>abeM</i>	AB204810	CATGTGTTTGGCGTACCAGAAAG CAAAGCAGGTATTGGTCCTAAGC	2	222
<i>adeB</i>	CT025812	GCTGCTCAAGATGAACTTATGGC GCATACGTCCTTGATTAGGGAAG	2	214
<i>adeR</i>	CP001172	CGCATAGGTGCAGATGACTTTG CGCTATGAGTGTCCGGTATCAATTTT	1	157
<i>adeS</i>	NC_009085	GATATGGCTCAAAGCTAGAGGTTTC GTCCGTAAGTCTTCGACTAAGTGAG	2	206
<i>ant(2'')-Ia</i>	EU977566	CACGCAAGCACGATGATATTGATC TTTCATACGCTTCGCTGCCCC	1	180
<i>ant(3'')-Ia, -Ib, -(9)</i>	DQ112355	TTGCTGGCCGTRCATTTGTAC GCACTACATTTCGCTCATCGC	2	484
<i>ant(3'')-Id, -Ie</i>	AF137361	TTGCTCTTGCTCGCATTGG TCTTCGACGCGCATTGCTAG	3	172
<i>aph(3')-I</i>	CT025832	GCAATCAGGTGCGACAATCTATC CTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCC	2	230
<i>aph(3')-II</i>	X57709	CTATGACTGGGCACAACAGAC GTTACAACGTCGAGCACAGC	2	192
<i>aph(3')-III</i>	GQ900412	GATGTGGAACGGGAAAAGGAC TGGAGTGAAAGAGCCTGATGC	3	208
<i>aph(3')-VI</i>	EU977572	ATACAGTGCTCTCGTGAAGCG TGGTCTCCCCATAATTCAGTGTC	3	333
<i>armA</i>	EU140571	GGGGTCTTACTATTCTGCCTATCC GCTAATGGATTGAAGCCACAACC	2	207
<i>arr</i>	EU340416	GGTAAAAGATTGGATTCCCATCTCTC AAACTGCTGGCTCCATCAAG	1	183
<i>bla<sub>ADC</sub></i>	EF433778	ACGTATAACAAGTGGTAACCTTGCC GTTGAGCCAGTTTTATGGTACATC	3	617
<i>catA</i>	M62822	ACCTATAACCAGACCGTTTCAGC GGAAAACGGTGTAAACAAGGGTG	2	193
<i>catB-3, -8</i>	AY557339	CGGTAYAGCTATTACTCTGGCTACTATC ATCTTTTGTCCACCAACGAGCG	3	439
<i>cmlA</i>	GQ388247	GCTCTTGTGGACCGCTATC GCGACCTGCGTAAATGTAC	1	205

## Anhang

Target	Referenz	Primer	Primer-pool	Produkt-größe
<i>craA</i>	CU468230	GTGGTGCATCTGTTGCATGG GCCATGACTTTAATCGCATCACG	1	242
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	EU938349	GACGATGTCACTGGCTGAG GAGGTGAAGTGGTATCACGC	3	206
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	AB176535	CTGGAAGCCCTGGAGAAAAG GCTTATCGCTCTCGCTCTG	3	168
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	AM040708	GATAATACGCAGGTGCTTTATCGC TTTGTTCATGGCGGTATTGTCC	2	252
<i>dfrA1</i>	FJ792804	GAATGGAGTTATCGGGAATGGC CCCACCACCTGAAACAATGAC	1	269
<i>dfrA7</i>	HM451497	CGTCAGAAAATGGCGTAATCGG CGTGAACAGTAGACAAATGAATTATATCTGC	2	253
<i>dfrA10</i>	NC_010410	TCAGAGACACAACCAAACCAATC ACAGAATCTATTGGATCACCTACCC	2	214
<i>dfrA12</i>	EF204550	CAATGGTCCTAATATCCCCTGG GAAACAACACTACGCAGCCAGTG	2	186
<i>dfrA15</i>	HQ880256	GAATGGAGTTATCGGGAATGGC ACCACCACCAGACACAATCAC	1	269
<i>bla<sub>DHA</sub></i>	HM568877	ATCTGGCTACCTATACCGCAG GGTGTGAGATAACCCCAGC	2	239
<i>floR</i>	CT025832	ATGTGGGTTGTCCGCGTC AGACGACTGGCGACTTCTC	3	277
<i>bla<sub>GES</sub></i>	FJ538287	TACTGGCAGGGATCGCTC CTCGGTGCCTGAGTCAATTC	2	228
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	AJ620678	TTGCCAGCTTAGCTCAGG TAGCCATAACCTGGTATCCCC	1	230
<i>gyrA</i>	NC_010400	TCGTGTGCTTTATGCCATGC CCTGACCATCAACCAATAAATAACG	1	182
<i>bla<sub>IMP1</sub></i>	EF375699	GGCGTTTTATGTTCACTTCGTTTG TATCCGCCCGTGCTGTC	3	216
<i>bla<sub>IMP2</sub></i>	AJ243491	AACACGGTTTGGTGGTTCTTG CTACGTTATCTTGAGTGTGCC	3	336
<i>intl</i>	EF375699	GTTCCGGTCAAGTTCCTGGAC TGGAGACCGAAACCTTGC	1	198
<i>IS1133</i>	AY138987	AAATGGCTTTTATAATCCACGCCG CGGTCTATCTCTCATTTAAGCGG	2	98
<i>IS1133-bla<sub>ADC</sub></i>	[143]	CCGCTTAAATGAGAGATAGACCG TTTGCATATCCACCTGCTGTC	3	n.a.
<i>ISaba1</i>	FJ628170	ATAATCACAAGCATGATGAGCGC CTAACGACGAATACTATGACACATCTC	2	113
<i>ISaba1-bla<sub>ADC</sub></i>	EU604835	GTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAAC TTTGCATATCCACCTGCTGTC	3	392
<i>ISaba1-adeS</i>	[144]	GTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAAC CGAGCCTTGATTGCTATATTGAATAG	3	781
<i>ISaba1-bla<sub>OXA-23</sub></i>	GQ861439	GTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAAC GGCTGGCACATATTCTGTATTTG	3	346
<i>ISaba1-bla<sub>OXA-51</sub></i>	DQ174097	GTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAAC CACGAGCAAGATCATTACCATAGC	3	299
<i>ISaba1-bla<sub>OXA-58</sub></i>	HQ005471	GTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAAC CGATGATTGAGTTATTCACCTGTGG	3	209
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	EU729727	CGCAACTGTAAGTTACCGC GTTGTCAGATATTTTTCCGAGATGG	3	180
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	HQ603057	AAATGGAACTGGCGACCAAC CTCCTGCTTGATCCAGTTGAG	1	212
<i>bla<sub>OXA-20-like</sub></i>	AY307114	TTGCAGGTCACAATCAAGACC TCTTGGTCGAGGGGTCTG	1	153
<i>bla<sub>OXA-23-like</sub></i>	EF534259	GACGTATCGGTCTTGATCTCATG GCTGTGTATGTGCTAATTGGGAAAC	3	159
<i>bla<sub>OXA-40-like</sub></i>	GU199040	GCACCTATGGTAATGCTCTTGC CGCTTTACTTCTTTCTGCATTAGC	3	263
<i>bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	AY236073	ATTTCCGGCCACGGAGCAA GTGGGCATATCCATATTCATCGC	1	239

## Anhang

Target	Referenz	Primer	Primer-pool	Produkt-größe
<i>bla<sub>OXA-51-like</sub></i>	EU255291	CGACCTTCAAATGCTTAATGCT CCATAACCAACACGCTTCACTTC	1	223
<i>bla<sub>OXA-58-like</sub></i>	EU107376	ATGGCACGCATTAGACCGAG GACCAATACGACGTGCCAATTC	3	231
<i>parC</i>	CP000863	GCCGTATTGTCTATGCTATGAGCG CTTCACGCAAATTATGTGGCGG	3	436
<i>bla<sub>PER</sub></i>	Z21957	GCCTGACGATCTGGAACCTT GCCTGTGATTTGTTATTTGAACTGG	3	284
<i>bla<sub>PSE</sub></i>	J05162	GGTGATTTGAGGGATACGACAAC TGTAATACTCCKAGCACCAAAATCC	3	216
<i>qacE</i>	CP001172	CCTTTTATTCAGCTAAAGGCAATGG CCAATCCCAATCCATCCTGC	2	143
<i>qnrA1</i>	AB325578	ATGCCAGTTTCGAGGATTGC CCCTGAACTCTATGCCAAAGC	3	154
<i>qnrB</i>	AM919399	GGCGCAAGYTTTATGAATATGATCAC GAGCAACGAYGCCTGGTAG	1	209
<i>bla<sub>RTG</sub></i>	AF135373	GCGGTTACCAATGCTGAAACTG GAGCGACATCCCTTTTTTACCC	1	264
<i>bla<sub>SCO</sub></i>	EF063111	GAGCGACACCCATTCTATTGATG CTCTGACCTTTATCCAACAGCG	3	186
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	AF462396	TTGACTGCCTTTTTGCGCC CGGTCTTATCGGCGATAAACC	3	266
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	GQ288397	TCAACACATTTCCACGACGAC CGTTATCTTGAGTGTGCTCCTGG	1	208
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	HM370523	GACCGTTGTCATTGTCTCTTCG TTTCCTCAAGTCGCAACTGC	1	206
<i>strA</i>	HQ018801	CGCCTCATTTGGCTCAAAG ATCAACCGATAGGCTGTGAAC	1	195
<i>strB</i>	CP002522	CTGTTCTCATTGCGGACACC CAACGATGTGAGAGAGCATTCCG	1	231
<i>sul1</i>	AY038837	GAAATGCTGCGAGTCGGA CAGGGTCAGGAAATCCTTGG	1	235
<i>sul2</i>	FN293019	TCAAAGAACGCCGAATGTG CGCAAGCCTATGCCTTGTC	1	193
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	AY359287	GCCTTCCTGTTTTGCTCACC CTGAGAATAGTGATGCGGCG	2	240
<i>tetA</i>	FJ172370	TTTGGTTCTCTATATCGGGCG AAACAGCCCGTCAGGAAATTG	3	250
<i>tetA(39)</i>	DQ195075	ATTACTCCAGCCCATGAGCG CCAAGCAATGGAGCCATATTAGG	1	286
<i>tetB</i>	AB089592	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTGG GTAAATAGCACCCACACCGTTG	2	309
<i>tetG</i>	AF071555	GTCGCTCTATGCATTGATGCAG CAATGGTTGAGGCTGCTACAG	2	220
<i>tetH</i>	AJ487672	CAACCCATTACGGTGTGCTATTAG GAGTCACATCACTCATCGCTG	1	249
<i>tetL</i>	FN435329	GTCGGTAATTGGGTTTGTGGC TGGGCTATCATTCCACCAATCG	1	217
<i>tetM</i>	DQ223648	GCAAAGTTCAGACTGACCTCG ACTTTACCGAATCTGAACAATGGG	3	248
<i>bla<sub>VEB</sub></i>	FJ825622	CGACTTCCATTTCCCGATGC CAATCGTCAAAGTTGTTCCATTAGGG	3	182
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	EF690695	TGGTCTCATTGTCCGTGATG GCTCGATGAGAGTCCTTCTAG	2	274

## Anhang

**Tabelle 17: Auflistung aller Sonden die für den finalen Microarray genutzt wurden in Sense-Orientierung. Angegeben sind deren Bezeichnung, der Name ihres jeweiligen Targets und ihre Sequenz. Sonden in Antisense-Orientierung sind nicht separat dargestellt**

Sondenname	Target	Sequenz
AAC3Ia_S1	<i>aac(3)-Ia</i>	GCTCCGTAGTAAGACATTCATCGC
AAC3Ia_S2	<i>aac(3)-Ia</i>	AACATCAGCCGGACTCCGATTA
AAC3Ia_S3	<i>aac(3)-Ia</i>	CTATGATCTCGCAGTCTCCGGC
AAC3IIa_S1	<i>aac(3)-IIa</i>	GCACTGTGATGGGATACGCAT
AAC(3)II_S2	<i>aac(3)-IIa</i>	TGGCACTGTGATGGGATACG
AAC3II_S2	<i>aac(3)-IIa</i>	TGGCACTGTGATGGGATACG
AAC3IV_S1	<i>aac(3)-IV</i>	CCGCAAAGGCCAAATGGATGG
AAC6Iad_S1	<i>aac(6')-Iad</i>	ATCAAGCTGTCCGGTTTGCTC
AAC6Ib_S1	<i>aac(6')-Ib, -I31</i>	GAAACCGATCCAGGAGTACGC
AAC6Ilg_S1	<i>aac(6')-Ilg</i>	CCGATCACCAAGCTATTGCGATG
AAC6Ih_S1	<i>aac(6')-Ih</i>	GGCTTATACCGACACCCAACAAG
AAC6Ih_S1*	<i>aac(6')-Ih</i>	GCCTGTGGCTTTTTYTGAAGG
AAC6Ij_S1	<i>aac(6')-Ij</i>	GCATCGCAACACATCTGGTTC
AAC6Ik_S1	<i>aac(6')-Ik</i>	GATGATCACGCGTTGGCATG
AAC6IL_S1	<i>aac(6')-IL</i>	TGGATGGACCGGATTAAGGC
AAC6IL_S2	<i>aac(6')-IL</i>	ATGCTTGGGAATATGTCTGGATGAT
AAC6IL_S3	<i>aac(6')-IL</i>	GGCAAGGGTTTTGGGAAAGTAC
AAC6Irw_S1	<i>aac(6')-Irl, -Irw</i>	GCATGTACYGAATTTGCTTCAGATGC
AAC6Istuv_S1	<i>aac(6')-Ils, -Ilt, -Ilu, -Ilv</i>	GTGGCTTTTCTTGAAGGGATTTATGT
abeM_S1	<i>abeM</i>	CGAGGCTATTCCGAAGCATTAGG
adeB_S1	<i>adeB</i>	GAATGAAGGGTTGCCACAAGGT
adeR_S_116Leu	<i>adeR 116L mut</i>	GAAGCCTTTTAACTAAATGAAGTC
adeR_S_116Pro	<i>adeR 116P wt</i>	GAAGCCTTTTAAACCAAATGAAGTC
adeS_S_153Met	<i>adeS 153M mut</i>	CACATGAGTTAAGAATGCCTATAACGATAT
adeS_S_153Thr	<i>adeS 153T wt</i>	CACATGAGTTAAGAACGCCTATAACGATAT
adeS_SRX	<i>adeS deletiert</i>	GGTTTAGGCTTTGCTGTTGTACATG
adeS_SFX	<i>adeS deletiert</i>	GCCTTAACTATTGTRAATTTAAGCGTTACGC
ANT2Ia_S1	<i>ant(2'')-Ia</i>	GTTGGACTATGGATTCTTAGCGGAG
ANT3_9_S1	<i>ant(3'')-9</i>	CTTGGAAGTGACCATCGTCGTG
ANT3Ia_S1	<i>ant(3'')-Ia</i>	GGTGACCGTAAGGCTTGATGAAAC
ANT3Ia_S2	<i>ant(3'')-Ia</i>	AAACTTCGGCTTCCCCTGGA
AADA2_S1	<i>ant(3'')-Ia, -9</i>	CGAGCATTGCTCAATGACCTTATGG
AADA4_5_S	<i>ant(3'')-Id, -Ie</i>	ATGGGTATCGGAGCGTTTGC
APH6_S1	<i>aph(3')-I</i>	GGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAG
APH2_S1	<i>aph(3')-II</i>	GGTGCCCTGAATGAAGTGA
APH2_S2	<i>aph(3')-II</i>	GTCAAGACCGACCTGTCCG
APH2_S3	<i>aph(3')-II</i>	CAATCGGCTGCTCTGATGG
APH3_S1	<i>aph(3')-III</i>	CTTTGAACGGCATGATGGCTG
APH1_S1	<i>aph(3')-VI</i>	GCTTGCTATCTATAAGGAGGCACTC
armA_S1	<i>armA</i>	GTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAG
arr_S1	<i>arr</i>	GCAAGGACCGTTCTATCATGGAAC
ampC_S1	<i>blaADC</i>	GATTGTGATGAAACCTAATAAAGTGAAGTC
ampC_S_148Q	<i>blaADC 148 mut</i>	CAATCGGTGAATATCAACAATATTCAAAC
ampC_S_148R	<i>blaADC 148 wt</i>	CAATCGGTGAATATCGACAATATTCAAAC
ampC_S_148_WT	<i>blaADC 148 wt</i>	CAATCGGTGAATACAGACAATATTCAAAT
ampC_S_208A	<i>blaADC 208 mut</i>	GCCGATTTCGAGCTAACCCC
ampC_S_208V	<i>blaADC 208 wt</i>	GCCGATTTCGAGTTAACCCC
ampC_S_210R	<i>blaADC 210 mut</i>	AGTTAACCGCGGCCCACT
ampC_S_210P	<i>blaADC 210 wt</i>	AGTTAACCCCGGCCCACT
ampC_S_215A	<i>blaADC 215 mut</i>	CACTCGATGCCGCCCWGCATAT
ampC_S_215	<i>blaADC 215 wt</i>	CACTCGATGCCGCCCWGCATAT
ampC_S_283S	<i>blaADC 283 mut</i>	CTTTATTAGACAGTAGTTCAGAACAGATTGTG
ampC_S_283N	<i>blaADC 283 wt</i>	CTTTATTAGACAGTAATTCAGAACAGATTGTG
ampC_SX	<i>bla<sub>ADC</sub> überexprimiert</i>	GGTATGGCTGTGGGTGTTATTCA

## Anhang

Sondename	Target	Sequenz
PSE_S3a	<i>bla</i> <sub>CARB1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9</sub>	TTCACCATCCAAGACTCTAATTTTTCTG
PSE_S1	<i>bla</i> <sub>CARB1, 2, 7, 8</sub>	CAACTCCTAAGGCAATAGCCAGTAC
CARB4_S1	<i>bla</i> <sub>CARB4</sub>	TTGCGGTCAGTATTGCCAGAG
PSE_S3b	<i>bla</i> <sub>CARB4</sub>	TTCACCATCCAATACTCTAATTTTTCTG
CARB-5_S1	<i>bla</i> <sub>CARB5,10</sub>	AGCAATCTCGTTACATACTCACCTG
CTXM1_S1	<i>bla</i> <sub>CTX-M1-like</sub>	ACGTTCCGTCTCGACCGTA
CTXM1_S2	<i>bla</i> <sub>CTX-M1-like</sub>	GCTACAGTACAGCGATAACGTGG
CTXM_S1	<i>bla</i> <sub>CTX-M2-like</sub>	CGCTGATTAACACCGCCGATA
CTXM2_S1	<i>bla</i> <sub>CTX-M2-like</sub>	ACCGCCGATAATTCGCAGAT
CTXM9_S1	<i>bla</i> <sub>CTX-M9-like</sub>	GCAGAGTGAAACGCAAAAGCA
DHA_S1	<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	GATATGCGTCTGTATGCAAACAGC
GES_S1	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GCTCAGATCGGTGTTGCGA
GIM_S1	<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	CGACACACCTTGGTCTGAAGAAG
IMP1_S1	<i>bla</i> <sub>IMP1</sub>	GACTACTCCATTTACGGCTAAAGATACTG
IMP2_S1	<i>bla</i> <sub>IMP2</sub>	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTA
IMP2_S2	<i>bla</i> <sub>IMP2</sub>	GCGCGGCTATAAAATCAAAGGC
KPC_S	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ACCCATCCGTTACGGCAAAA
NDM_S1	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	AGTCGCTTCCAACGGTTTGAT
OXA37_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-20-like</sub>	CCGTTTGGGTCTATCAACTATTCGC
OXA23_SX	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> überexprimiert	CCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGAC
OXA23_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	GGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGT
OXA23_S2	<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	GGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAG
OXA24_SX	<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> überexprimiert	CTATTCTAGTTTCTCTCAGTGCATGTTTCATC
OXA24_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub>	GATATGACTTTAGGTGAGGCAATGGC
OXA48_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	GGGTCGGTTGGGTTGAACT
OXA51_SX	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> überexprimiert	TTATTTACGCCTGCTCACCTTATATAGTG
OXA58_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	GATTTTACTTTGGGCGAAGCCATG
OXA58_SX	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> überexprimiert	CATAAGTATTGGGGCTTGTGCTGA
OXA51_S1	<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	CAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTG
PER1_S1	<i>bla</i> <sub>PER1, 3, 4, 5</sub>	CAGACCGTTATCGTAAACAGGGCT
PER2_S1	<i>bla</i> <sub>PER2</sub>	GTCTGTTACTGTTAATCGTGCTGC
SCO_S1	<i>bla</i> <sub>SCO</sub>	TGGTTCCACCGTGCTGATG
SHV_S1	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	GTTGATCCGCTCCGTGCT
SHV_S2	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	TGGGAAACGGAAGTGAATGAGG
SIM_S1	<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	GGCTTAATACAAAGTCCATCCCCAC
SPM_S1	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	CGGCACGGGTGGAATGAAA
TEM_S1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TGCACGAGTGGGTTACATCG
TEM_S2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC
VEB_S1	<i>bla</i> <sub>VEB</sub>	CCGATTGCTTTAGCCGTTTTGTC
VIM_S	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GCAGTCTCCACGCACTTTCA
catI_S	<i>catA/catI</i>	TTCTTGCCCGCCTGATGAAT
catB3_S	<i>catB3</i>	GCTACTATCATGGGCACTCATTCCG
catB3_8_S	<i>catB3</i> , -8	ATCATGGCTGGCAATCAGGG
cmlA1_S1	<i>cmlA</i>	GGCTTCGGATTCTCAGGCTTG
dhfr1_S	<i>dhfrA1</i>	GTTGGTTGGACGCAAGACTTTTTG
dhfr1_S2	<i>dhfrA1</i>	TGCCAAAGGTGAACAGCTCC
dhfr1_S3	<i>dhfrA1</i>	GTATGCGGTCGTAACACGTTCAAG
dhfr1_S5	<i>dhfrA1</i>	TCAATGGGAGCATTACCCAACC
dhfr1_S6	<i>dhfrA1</i>	CAAGTTTTACATCTGACAATGAGAACGTA
dhfr1_S7	<i>dhfrA1</i>	CCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACC
dhfr1_S4	<i>dhfrA1</i> , 15	CCCTGATATTCATGGAGTGCC
dhfr10_S1	<i>dhfrA10</i>	CCTGTTTCATGCTGATGTGTATGTACC
dhfr12_S	<i>dhfrA12</i>	TCACTGAGGGAAAAGTCGTTGTC
dhfr7_S	<i>dhfrA7</i>	TCTCTGGTGGCGGTCAAATC
dhfr7_S2	<i>dhfrA7</i> , 17	CATTTGACTCTATGGGTGTTCTTCAAATC
floR_S1	<i>floR</i>	TCTTCACGGTGTCCGTTACC
GyrA_S_242T	<i>gyrA</i> 83L mut	CATGGTGACTTAGCTGTTTATGAAACC
GyrA_S_242C	<i>gyrA</i> 83S wt	CATGGTGACTCAGCTGTTTATGAAACC

## Anhang

Sondename	Target	Sequenz
GyrA_S_242C_254A	<i>gyrA</i> 87E wt	GACTCAGCTGTTTATGAAACCATTGT
GyrA_S_242T_254A	<i>gyrA</i> 87E wt	GACTTAGCTGTTTATGAAACCATTGT
GyrA_S_242C_254G	<i>gyrA</i> 87G mut	GACTCAGCTGTTTATGAAACCATTGT
GyrA_S_242T_254G	<i>gyrA</i> 87G mut	GACTTAGCTGTTTATGAAACCATTGT
IS1133_SX	Insertion von IS1133	GGAACACAACCGGTGCAAG
ISaba_SX	Insertion von ISaba1	TGACATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTT
intl_S1	<i>intl</i>	GTTTCCACGGTGTGCGTCA
intl_S2	<i>intl</i>	GGCATTCTGTCTGCTGGCTGG
intl_S3	<i>intl</i>	GAGCGCATACGCTACTTGCATTAC
IS1133_S1	IS1133	GAAGACATTCAACTCGGCTG
ISaba1_S1	ISaba1	TCACAAGCATGATGAGCGCA
ISaba1_S2	ISaba1	TTGATGGGCAAGGCTTAGATGC
ISaba1_S3	ISaba1	TGTGACTTGTCCATTTAGAGATTTGTTT
Mdfa_S1	<i>craA</i>	CGTAATTCAGCAGTGGGATATGCC
Parc_S_AB_251T_T	<i>parC</i> 80L mut	CACATGGTGATTTGGCATGTTAT
Parc_S_AG_251T_T	<i>parC</i> 80L mut	CGCATGGTGATTTGGCATGTTAT
Parc_S_AB_251T	<i>parC</i> 80L mut	CACATGGTGATTCGGCATGTTAT
Parc_S_AG_251T	<i>parC</i> 80L mut	CGCATGGTGATTCGGCATGTTAT
parC_S_AB_251_TTT	<i>parC</i> 80S 2mut	CACATGGTGACTTTGCATGTTAT
Parc_S_AB_251C_T	<i>parC</i> 80S wt	CACATGGTGACTTGGCATGTTAT
Parc_S_AG_251C_T	<i>parC</i> 80S wt	CGCATGGTGACTTGGCATGTTAT
Parc_S_AB_251C	<i>parC</i> 80S wt	CACATGGTGACTCGGCATGTTAT
Parc_S_AG_251C	<i>parC</i> 80S wt	CGCATGGTGACTCGGCATGTTAT
ParC_S_AB_262G	<i>parC</i> 84E wt	GCATGTTATGAAGCCATGGTACT
ParC_S_AG_262G	<i>parC</i> 84E wt	GCATGTTATGAAGCCATGGTGTT
ParC_S_AB_262A	<i>parC</i> 84K mut	GCATGTTATAAAGCCATGGTACT
ParC_S_AG_262A	<i>parC</i> 84K mut	GCATGTTATAAAGCCATGGTGTT
qacE_S1	<i>qacE</i>	ATGTGTTGTGGTCTGGGGTG
qacE_S2	<i>qacE</i>	GGTATTGGCGACCGCTTTTCTC
qacE_S3	<i>qacE</i>	GTGTTGTGGTCTGGGGTGGGG
qacE_S4	<i>qacE</i>	GCAAGCTGGAATTTATATGTGTTGTGG
qnrA1_8_S1	<i>qnrA1</i> , <i>qnrA8</i>	CACCTCAGCTATGCCGATCTGC
qnrB1_S1	<i>qnrB1</i> sp.	ACTTTCGACTGGCGAGCAG
qnrB_S2	<i>qnrB1</i> sp., <i>qnrB4</i> sp.	TTCGACTGGCGAGCAGCR
strA_S1	<i>strA</i>	TCAACTGGCAGGAGGAACAG
strB_S1	<i>strB</i>	GCCGACTATCTGGTATGGCG
sul1_S1	<i>sul1</i> , <i>sul3</i>	CCGATGAGATCAGACGTATTGCG
sul2_S1	<i>sul2</i>	CGAGTTTGGCAGATGATTTCCG
tetA39_S1	<i>tet39</i>	GGTAATAGGTGGAGTTTTGGGTGAATG
tetA_S1	<i>tetA</i>	TATCACTGATGGCGATGAGCG
tetA_S2	<i>tetA</i>	CCCACGCTCCGTTCTTCG
tetA_S3	<i>tetA</i>	ATGAGCGCCTGTTTCGGGTTC
tetB_S1	<i>tetB</i>	GATACCGAAGTAGGGTTGAGACG
tetG_S1	<i>tetG</i>	GAGCCGCAGTCGATTACACG
tetH_S1	<i>tetH</i>	GGCATTCTCAACCACACTTTGG
tetL_S1	<i>tetL</i>	CCAGCACTCGTAATGGTTGTAGT
tetM_S1	<i>tetM</i>	CCGTGATAAACAGGGAACAGGG
tetM_S2	<i>tetM</i>	CACCTCCGTGATAAACAGGGAACAG
tetM_S3	<i>tetM</i>	CTTATGCTTTCCTCTTGTTCGAGTTC

## Anhang

Tabelle 18: Klinische Isolate, die zur Validierung des entwickelten Microarrays eingesetzt wurden

Herkunft	Spezies	Bezeichnung	bekannte Gene für Carbapenemasen
RBK	Acinetobacter spp.	AC1	
RBK	Acinetobacter spp.	AC2	
RBK	Acinetobacter spp.	AC3	
RBK	Acinetobacter spp.	AC4	
RBK	Acinetobacter baumannii	AC5	
RBK	Acinetobacter spp.	AC6	
RBK	Acinetobacter spp.	AC7	
RBK	Acinetobacter spp.	AC8	
RBK	Acinetobacter spp.	AC12	
RBK	Acinetobacter spp.	AC13	
RBK	Acinetobacter spp.	AC14	
RBK	Acinetobacter baumannii	AC15	
RBK	Acinetobacter spp.	AC16	
RBK	Acinetobacter spp.	AC17	
RBK	Acinetobacter spp.	AC18	
RBK	Acinetobacter spp.	AC20	
RBK	Acinetobacter spp.	AC21	
RBK	Acinetobacter spp.	AC22	
RBK	Acinetobacter spp.	AC23	
RBK	Acinetobacter spp.	AC24	
RBK	Acinetobacter spp.	AC25	
RBK	Acinetobacter spp.	AC26	
RBK	Acinetobacter spp.	AC27	
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2550	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-3617	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-298	ISAb1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-484	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-520	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-719	
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1002	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1276	ISAb1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1377	ISAb1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1395	ISAb1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1473	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1812	ISAb1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-1893	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2116	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2134	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2169	bla <sub>OXA-164</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2213	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2367	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2388	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2400	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2451	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2584	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2613	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	Acinetobacter baumannii	NRZ-2713	bla <sub>OXA-58</sub>

## Anhang

Herkunft	Spezies	Bezeichnung	bekannte Gene für Carbapenemasen
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-2765	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-2826	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3030	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3048	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3077	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3127	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3210	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3364	ISAba1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3402	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3539	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3602	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3663	bla <sub>OXA-164</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3785	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-3943	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-4029	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-4109	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-1397	ISAba1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-1776	bla <sub>NDM-1/6</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-20	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-39	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-1257	ISAba1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-212	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-218	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-400	ISAba1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-687	bla <sub>NDM-2</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-817	bla <sub>OXA-58</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-952	bla <sub>GES-11</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-1110	ISAba1-bla <sub>OXA-51</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-1320	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-2638	bla <sub>OXA-72</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-2664	bla <sub>OXA-23</sub>
NRZ	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-2697	bla <sub>OXA-72</sub>

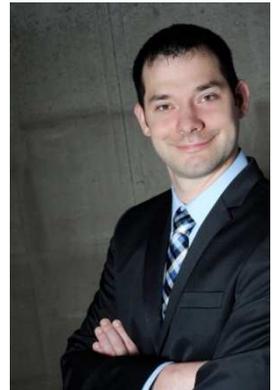
**10. Curriculum Vitae**

# Curriculum Vitae

## Simon Dally

---

Name	Simon Dally (geb. Ohler)
Geburtstag	16.04.1983
Geburtsort	Stuttgart

**Wissenschaftlicher Werdegang**

- 
- |                   |   |
|-------------------|---|
| 01/2010 – 2013    | <p><b>Promotion;</b> Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie in Kooperation mit dem Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, dem Fraunhofer IGB, Stuttgart und dem Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart</p> <p>Titel: Entwicklung eines Microarrays zur Detektion von Resistenzdeterminanten in <i>Acinetobacter baumannii</i></p> |
| 02/2009 – 12/2009 | <p><b>Diplomarbeit;</b> Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik der Fraunhofer Gesellschaft</p> <p>Titel: Detektion bakterieller Resistenzen in Sepsis-assoziierten Pathogenen mittels Microarrays</p>  |
| 09/2008 – 02/2009 | <p><b>Studienarbeit;</b> Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart</p> <p>Titel: Diagnostische Studie zur Sepsisdiagnostik mittels des PCR-basierten VYOO Testsystems der Fa. SIRS-Lab im Vergleich zu automatisierten Blutkultursystemen</p>   |

## Ausbildung

---

- 10/2003 – 01/2010      **Studium der Technischen Biologie;** Universität Stuttgart  
 Hauptfach: Immunbiologie; Nebenfächer: Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie und Biochemie  
 Diplomabschluss mit Auszeichnung (Note 1,0)
- 09/2002 – 05/2003      **Zivildienst**
- 1993 – 2002              **Schelztor Gymnasium;** Esslingen  
 Abitur mit der Note 1,8
- 1989 – 1993              **Grund- und Hauptschule Esslingen**

## Publikationen

---

- Fachartikel              *DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in Acinetobacter baumannii clinical isolates*  
**Dally S,** Lemuth K, Kaase M, Rupp S, Knabbe C, Weile J.  
 Antimicrob Agents Chemother. 2013 Oct;57(10):4761-8
- Single stranded DNA catalyzes hybridization of PCR-products to microarray capture probes*  
**Dally S,** Rupp S, Lemuth K, Hartmann SC, Hiller E, Bailer SM, Knabbe C, Weile J.  
 Zur Publikation eingereicht 2014
- A VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolate in an acute hospital in Germany*  
 Weile J, **Ohler S,** Schönthal S, Knabbe C.  
 Int J Antimicrob Agents. 2009 Apr;33(4):389-91
- Poster                      *Development of a DNA-microarray for the detection of resistance determinants in Acinetobacter spp.*  
**Dally S,** Lemuth K, Rupp S, Knabbe C, Weile J  
 Functional Genomics - Next Generation Applications and Technologies  
 03.02.2011 - 04.02.2011, Frankfurt, Deutschland
- Resistance analysis of Acinetobacter spp. by DNA-microarrays*  
**Dally S,** Lemuth L, Rupp S, Bailer SM, Knabbe C, Weile J  
 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.  
 30.09.2012 - 03.10. 2012, Hamburg, Deutschland