

Aus dem Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI,
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB) in Potsdam

DISSERTATION

Nachweis und Charakterisierung von Antibiotika-resistenten
Staphylokokken mittels Multiplex-PCR und DNA-Microarray

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Zeinab G. Sheim

Aus Libyen

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung.....	10
Abstract	11
1. Einleitung.....	12
1.1. Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	12
1.1.1. Staphylococcus aureus	12
1.1.2. Virulenzfaktoren von MRSA	13
1.1.3. Geschichte und Ausbreitung von MRSA	14
1.1.4. Resistenzmechanismus von MRSA.....	15
1.1.5. Die Genregulation der Resistenz von MRSA	16
1.1.6. Prävention und Therapie einer MRSA-Infektion	17
1.1.7. Nachweismethoden für MRSA	19
1.2. Prinzip einer Polymerase–Kettenreaktion (PCR).....	21
1.2.1. Optimierung einer Multiplex-PCR	22
1.3. DNA-Microarray	24
1.3.1. Prinzip von Sonden.....	26
1.3.2. SNP- und Nicht SNP- Sonden.....	27
1.4. Ziel der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	29
2.1. Materialien	29
2.1.1. Staphylokokken-Stämme vom RKI	29
2.1.2. Chemikalien.....	32
2.1.3. Oligonukleotidprimer	33
2.1.4. Enzyme und Kits	33
2.1.5. Geräte.....	34
2.1.6. Bioinformatische Anwendungen.....	34
2.2. Methoden	34
2.2.1. Isolation der genomischen DNA.....	34

2.2.2. Optimierung einer Multiplex-PCR	35
2.2.3. Einsatz von Markierungs-PCR für DNA-Amplifikation.....	37
2.2.4. Gelelektrophorese.....	38
2.2.5. DNA-Aufreinigung	38
2.2.6. Ermittlung der Dy647P1- Einbaurate und Verdau der DNA.....	39
2.2.7. DNA-Microarray	40
2.2.8. Hybridisierung und Auswertung	45
3. Ergebnisse.....	48
3.1. Amplifikation der Ziel-DNA mittels einer optimierten Multiplex-PCR.....	48
3.2. Markierungs-PCR.....	57
3.3. Hybridisierung, Scannen und Auswertung.....	60
4. Diskussion.....	70
4.1. Etablierung und Optimierung einer Multiplex-PCR	70
4.2. Hybridisierung der Ziel-DNA auf einem DNA-Microarray.....	72
4.3. Erläuterung aller Hybridisierungsergebnisse mittels eines Flussdiagramms.....	76
5. Fazit und Ausblick.....	82
6. Literaturverzeichnis.....	83
7. Anhang.....	87
8. Danksagung	126
9. Eidesstattliche Versicherung	127
10. Lebenslauf	128

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
RKI	Robert-Koch-Institut
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
SNP	engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
SCCmec	Staphylococcus Cassette Chromosome mec
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale DNA
U	Units
nd	engl. <i>no data</i> (keine Daten)
PCR	Polymerase ketten reaktion
gDNA	genomische DNA
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'triphosphate
NTC	engl. <i>No template control</i> (Kontrolle)
IvD	<i>In vitro</i> Diagnostik
LOD	engl. <i>limit of detection</i> (Detektionslimit)
SD	Standardabweichung
MM	engl. <i>miss match</i> (Fehlpaarung)
PM	engl. <i>Perfect match</i>
HybCon	Hybridisierungskontrolle
R	Einbaurate
NHK	negative Hybridisierungskontrolle
PHK	positive Hybridisierungskontrolle

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Staphylokokken-Stämme	29
Tabelle 2: Die Chemikalien.....	32
Tabelle 3: Die Primer-Sequenzen.	33
Tabelle 4: Die verwendeten Kits von Qiagen	33
Tabelle 5: Die Laborgeräte.....	34
Tabelle 6: Die Sonden.....	41
Tabelle 7: Das erste PCR-Protokoll	49
Tabelle 8: Das neue optimierte PCR-Protokoll.....	57
Tabelle 9: Das optimierte Multiplex-Markierungs-PCR-Protokoll mit PCR-Programm	58
Tabelle 10: Das optimierte Monoplex-Markierungs-PCR-Protokoll für 23S-rDNA.....	59
Tabelle 11: Zusammenfassung aller Hybridisierungsergebnisse	62
Tabelle 12: Zusammenfassung der Aktuellen Sondenspezifität	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRSA-Keim	12
Abbildung 2: SCCmec-Element.....	16
Abbildung 3: Resistenzmechanismus vom <i>mecA</i> -Gen.....	17
Abbildung 4: Prinzip einer PCR.....	22
Abbildung 5: Ablauf einer DNA-Microarray mikrobieller Probe.....	25
Abbildung 6: Microarray-Layout	44
Abbildung 7: Gelelektrophorese der ersten Multiplex-PCR	49
Abbildung 8: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR.....	50
Abbildung 9: Gelelektrophorese einer Screening-PCR. <i>Taq</i> -Polymerase Konzentrationen 0,4 U/ μ L bzw. 0,2 U/ μ l	51
Abbildung 10: Gelelektrophorese einer Screening-PCR. <i>Taq</i> -Polymerase Konzentrationen 0,4 U/ μ L bzw. 0,3 U/ μ l	52
Abbildung 11: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. Primerkonzentration von 0,6 μ M (23S-rDNA) und 0,4 μ M (16S-rDNA und <i>mecA</i>), <i>Taq</i> -Pufferkonzentration von 1,00 x.....	53
Abbildung 12: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. Primerkonzentration von 0,7 μ M (23S-rDNA) und 0,4 μ M (16S-rDNA und <i>mecA</i>), <i>Taq</i> -Pufferkonzentration von 0,80 x.....	53
Abbildung 13: Gelelektrophorese einer PCR. PCR-Ansätze A und B, 0,4 mM dNTPs, 0,6 Mm dNTPs. Elongationstemperatur von 72 °C und 68 °C.....	54

Abbildung 14: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. Elongationstemperatur von 65 °C und 86 °C.....	55
Abbildung 15: Gelelektrophoreses einer PCR. Elongationszeit von 120 s.....	56
Abbildung 16: Gelelektrophorese einer PCR. Elongationszeit von 90 s	56
Abbildung 17: Gelelektrophorese einer Multiplex-Markierungs-PCR.....	58
Abbildung 18: Gelelektrophoresebild einer Monoplex-Markierungs-PCR.....	59
Abbildung 19: Ein Flussdiagramm aller Hybridisierungsergebnisse.....	77
Abbildung 20: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Sep1498 dar.....	78
Abbildung 21: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Sau230i_T dar.....	79
Abbildung 22: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung des Sondensatzes Sep195i dar....	80
Abbildung 23: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Shaem66i_A dar.....	81
Abbildung 24: DNA-Microarray von Slide 1	87
Abbildung 25: DNA-Microarray von Slide 2	88
Abbildung 26: DNA-Microarray von Slide 3	89
Abbildung 27: DNA-Microarray von Slide 4.....	90
Abbildung 28: DNA-Microarray von Slide 5	91
Abbildung 29: DNA-Microarray von Slide 6	92
Abbildung 30: DNA-Microarray von Slide 7	93
Abbildung 31: DNA-Microarray von Slide 8.....	94
Abbildung 32: DNA-Microarray von Slide 9	95
Abbildung 33: Sondensignale vom <i>S. Sciuri</i> (12-00055)-Stamm	96
Abbildung 34: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-00322)-Stamm.....	96
Abbildung 35: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-00331)-Stamm	96
Abbildung 36: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-00376)-Stamm	97
Abbildung 37: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-00389)-Stamm.....	97
Abbildung 38: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-00390)-Stamm	97
Abbildung 39: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-00408)-Stamm.....	98
Abbildung 40: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-00644-1)-Stamm	98
Abbildung 41: Sondensignale vom <i>S. saprophyticus</i> (12-00675)-Stamm	98
Abbildung 42: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-00712)-Stamm.....	99
Abbildung 43: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-00812)-Stamm	99
Abbildung 44: Sondensignale vom <i>S. hominis</i> (12-00813)-Stamm.....	99

Abbildung 45: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-00962-3)-Stamm	100
Abbildung 46: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-00966)-Stamm.....	100
Abbildung 47: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-01000-2)-Stamm	100
Abbildung 48: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01152)-Stamm.....	101
Abbildung 49: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-01171)-Stamm.	101
Abbildung 50: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01207)-Stamm.....	101
Abbildung 51: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01244-2)-Stamm	102
Abbildung 52: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-01261-2)-Stamm	102
Abbildung 53: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01401)-Stamm.....	102
Abbildung 54: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01476)-Stamm.....	103
Abbildung 55: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-01536)-Stamm.....	103
Abbildung 56: Sondensignale vom <i>S. simulans</i> (12-01608)-Stamm.	103
Abbildung 57: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-01631)-Stamm.....	104
Abbildung 58: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-01795)-Stamm.....	104
Abbildung 59: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01856-1)-Stamm.	104
Abbildung 60: Sondensignale vom <i>S. sciuri</i> (12-01969)-Stamm	105
Abbildung 61: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-01970)-Stamm.....	105
Abbildung 62: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02020)-Stamm.....	105
Abbildung 63: Sondensignale vom <i>S. hominis</i> (12-02111-2)-Stamm.....	106
Abbildung 64: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02116)-Stamm.....	106
Abbildung 65: Sondensignale vom <i>S. lugdunensis</i> (12-02275)-Stamm.	106
Abbildung 66: Sondensignale vom <i>S. hominis</i> (12-02364)-Stamm.....	107
Abbildung 67: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02373)-Stamm.....	107
Abbildung 68: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02462)-Stamm.....	107
Abbildung 69: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02470)-Stamm.....	108
Abbildung 70: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02519)-Stamm.....	108
Abbildung 71: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-02616)-Stamm.	108
Abbildung 72: Sondensignale vom <i>S. Aureus</i> (12-02846)-Stamm	109
Abbildung 73: Sondensignale vom <i>S. Warneri</i> (12-02218)-Stamm	109
Abbildung 74: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02314)-Stamm.....	109
Abbildung 75: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02369)-Stamm.....	110
Abbildung 76: Sondensignale vom <i>S. sciuri</i> (12-02407)-Stamm	110

Abbildung 77: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02459)-Stamm.....	110
Abbildung 78: Sondensignale vom <i>S. Aureus</i> (12-02603)-Stamm	111
Abbildung 79: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-02612)-Stamm.	111
Abbildung 80: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02736)-Stamm.....	111
Abbildung 81: Sondensignale vom <i>S. warneri</i> (12-02757)-Stamm	112
Abbildung 82: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-02762)-Stamm.....	112
Abbildung 83: Sondensignale vom <i>S. hominis</i> (12-02047)-Stamm.....	112
Abbildung 84: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02743)-Stamm.....	113
Abbildung 85: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02776)-Stamm.....	113
Abbildung 86: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02794)-Stamm.....	113
Abbildung 87: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02797)-Stamm.....	114
Abbildung 88: Sondensignale vom <i>S. lugdunensis</i> (12-02810-3)-Stamm.	114
Abbildung 89: Sondensignale vom <i>S. epidermidis</i> (12-02812-2)-Stamm.	114
Abbildung 90: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02813)-Stamm.....	115
Abbildung 91: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02823)-Stamm.....	115
Abbildung 92: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02831)-Stamm.....	115
Abbildung 93: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02835)-Stamm.....	116
Abbildung 94: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02848)-Stamm.....	116
Abbildung 95: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02850)-Stamm.....	116
Abbildung 96: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02875)-Stamm.....	117
Abbildung 97: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02877)-Stamm.....	117
Abbildung 98: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02882)-Stamm.....	117
Abbildung 99: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02888)-Stamm.....	118
Abbildung 100: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02890-1)-Stamm	118
Abbildung 101: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02895)-Stamm.....	118
Abbildung 102: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02923)-Stamm.....	119
Abbildung 103: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02929)-Stamm.....	119
Abbildung 104: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02948)-Stamm.....	119
Abbildung 105: Sondensignale vom <i>S. haemolyticus</i> (12-02951)-Stamm.	120
Abbildung 106: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02955)-Stamm.....	120
Abbildung 107: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02962)-Stamm.....	120
Abbildung 108: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02974)-Stamm.....	121

Abbildung 109: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-02967)-Stamm.....	121
Abbildung 110: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03008-2)-Stamm	121
Abbildung 111: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03080)-Stamm.....	122
Abbildung 112: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03094)-Stamm.....	122
Abbildung 113: Sondensignale vom <i>S. pseudintermedius</i> (12-03098)-Stamm	122
Abbildung 114: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03101)-Stamm.....	123
Abbildung 115: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03133)-Stamm.....	123
Abbildung 116: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03135)-Stamm.....	123
Abbildung 117: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03148)-Stamm.....	124
Abbildung 118: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03171)-Stamm.....	124
Abbildung 119: Sondensignale vom <i>S. pseudintermedius</i> (12-03185)-Stamm	124
Abbildung 120: Sondensignale vom <i>S. pseudintermedius</i> (12-03205)-Stamm	125
Abbildung 121: Sondensignale vom <i>S. aureus</i> (12-03208)-Stamm.....	125

Zusammenfassung

Staphylokokken-Infektionen werden meist durch Bakterien verursacht, die sich bereits auf der Haut oder den Schleimhäuten ansiedeln. Die Ursache kann jedoch auch eine Übertragung der Bakterien durch andere Menschen sein. Im Krankenhaus entstehen immer wieder Infektionen, weil insbesondere der Stamm *Staphylococcus aureus* von Ärzten und Pflegekräften unbemerkt auf den Patienten übertragen wird. Diese Bakterien gehören daher auch zu den bekannten multiresistenten Krankenhauskeimen (MRSA) und auch zu Pathogenen, die besonders häufig mit Infektionen in Krankenhäusern oder sogenannten nosokomialen Infektionen assoziiert werden.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit richtete sich zunächst auf die Differenzierung von MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) und MSSA (Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus*) durch den Nachweis des *mecA*-Gens. Darüber hinaus wurden *Staphylococcus aureus* von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus* sowie weitere klinisch relevante Staphylokokken-Stämme mittels der 23S-rDNA- und 16S-rDNA-Gene unterschieden. Für diesen Zweck wurden 166 Staphylokokken-Stämme vom Robert Koch Institut (RKI) durch eine Multiplex-Markierungs-PCR amplifiziert und anschließend auf einem Microarray hybridisiert. Ein Microarray besteht grundsätzlich aus den verschiedenen Oligonukleotiden-Sequenzen oder Sonden, welche auf einem Objektträger aus Glas immobilisiert sind. Die Sonden dazu wurden so konzipiert, dass sie mittels der Nicht-SNP- und SNP-Sonden, die Stämme und das Vorhandensein der Resistenz detektieren können. Die Amplifikation der drei erwünschten Gene (23S-rDNA-, 16S-rDNA- und *mecA*-Gen) konnte hier in einer Multiplex-Fluoreszenzmarkierungs-PCR für alle Stämme nicht erzielt werden. Im Gegensatz dazu, konnte die Amplifikation aller Gene mit der optimierten Multiplex-Screening-PCR erfolgreich erreicht werden. Insbesondere zeigte die Amplifikation des 23S-rDNA-Gens mit 1840 bp in einer Multiplex-Markierungs-PCR bei mehreren Stämmen immer wieder viele Hindernisse und Schwierigkeiten. Somit musste eine zusätzliche Monoplex-Markierungs-PCR für das 23S-rDNA-Gen bei entsprechenden Stämmen angeschlossen werden. Abschließend kann man sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit *S. aureus* von *S. epidermidis*, *S. hominis* und *S. haemolyticus* sowie von anderen Stämmen zweifelsfrei mit Microarray identifiziert werden konnten. Des Weiteren konnte die Resistenz durch das Vorhandensein vom *mecA*-Gen erfolgreich nachgewiesen werden. Es wurde auch bestimmt, ob es sich um das *mecA*-Gen um SCCmec-Typ *mecA-I_X* oder *mecA-XI* handelt.

Abstract

Staphylococcal infections are usually caused by bacteria that already settle on the human skin or the mucous membranes. The cause can however also be a transfer of the bacteria by other humans. In the hospital arise always different infections, because in particular the *Staphylococcus aureus* strain of doctors and nurses is transferred without notice to the patients. These bacteria therefore belong to the known multiresistant hospitals germs (MRSA) and also to pathogens, which are particularly frequently associated with hospitals infections or so-called nosocomial infections.

The aim of this dissertation work was to differentiate MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and MSSA (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) by detecting the *mecA*-gene. Furthermore, *Staphylococcus aureus* from *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* as well as other Staphylococcal strains were distinguished via the 23S rDNA- and 16S rDNA-genes.

For this purpose, 166 staphylococcal strains from Robert Koch Institute (RKI) were amplified by multiplex labeling PCR and then hybridized on a microarray. The microarray basically consists of the different oligonucleotide sequences or probes, which are immobilized on a glass slide. The probes were designed to detect the strains and the presence of resistance with non SNP and SNP probes. Amplification of the three desired genes (23S-rDNA, 16S-rDNA and *mecA* gene) could not be achieved in a multiplex fluorescence labeling PCR for all strains. In contrast, the amplification of all genes was successfully achieved with the optimized multiplex screening PCR. In particular, the amplification of the 23S-rDNA gene with 1840 bp in multiplex labeling PCR showed several obstacles and difficulties in several strains. Thus, an additional monoplex labeling PCR for the 23S rDNA gene had to be performed in these strains. Finally, it can be said that within the scope of this study *S. aureus* from *S. epidermidis*, *S. hominis* and *S. haemolyticus* as well as other strains could be identified with use of the Microarray. Furthermore, was able to demonstrate the resistance successfully by proving the presence of the *mecA* gene. It was also determined whether the *mecA* gene is SCCmec type *mecA-I_X* or *mecA-XI*.

1. Einleitung

1.1. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ein globales Bakterium, welches grampositiv ist und morphologisch als goldgelbes Kokken auftritt. Sie sind nicht beweglich, bilden keine Sporen aus und sind Katalase-positive Bakterien. *S. aureus* ist häufig in Haufen bzw. Trauben angeordnet, weswegen er als Staphylococcus benannt wurde. Diese grampositiven Kokken leben fakultativ anaerob und die Größe des Bakteriums liegt bei 0,8 bis 1,2 µm. Staphylokokken können unter verschiedensten Umweltbedingungen wachsen, am besten jedoch bei Temperaturen zwischen 30 °C und 37 °C (1). *S. aureus* kommt fast ubiquitär in der Natur vor, auch siedelt er häufig beim Menschen in der Nase, auf der Haut, den Schleimhäuten des Oropharynx und in den Atemwegen. Da etwa 20 – 30 % der Menschen Träger von *S. aureus* sind, wurde diese Kolonisation als wichtiger Risikofaktor für das Auftreten von schweren Infektionen identifiziert (2). Obwohl *S. aureus* nicht immer pathologisch ist, ist er ein häufiger Verursacher von einer Vielzahl von Infektionen, insbesondere sind hier pyogene Infektionen wie beispielsweise Furunkel, Karbunkel, Pneumonie, Osteomyelitis, Abszesse und Sepsis zu erwähnen.

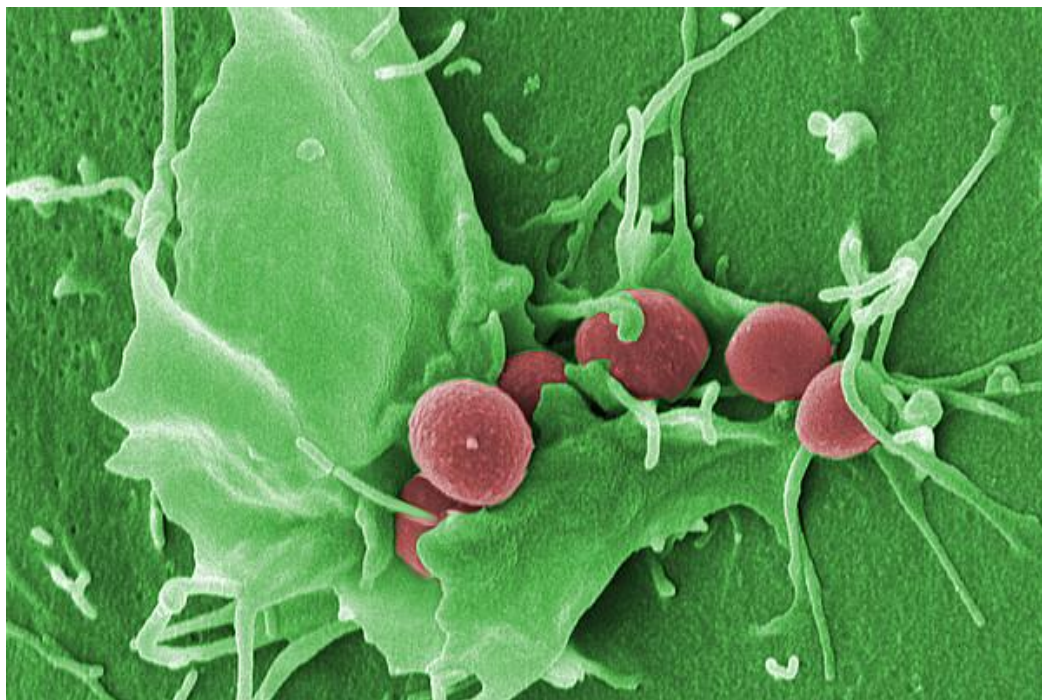


Abbildung 1: MRSA-Keim. Die resistente *Staphylococcus aureus*-Variante MRSA (rot) wurde von humanen Leukozyten (grün) eliminiert. Das Bild wurde entnommen von helmholtz-hzi.de.

Außerdem können Staphylokokken auch Toxine ausbilden und daher verschiedene Vergiftungskrankheiten hervorrufen, so beispielweise das Toxische Schocksyndrom (*TSS*), Lebensmittelvergiftungen und die staphylogene Toxische epidermale Nekrolyse (*TEN*). Des Weiteren zählen Staphylokokken zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen und verursachen aufgrund ihrer starken Virulenz ein ernstes öffentliches Gesundheitsproblem.

1.1.2. Virulenzfaktoren von MRSA

Zahlreiche der durch Ansteckung mit *S. aureus* hervorgebrachten Erkrankungen, beruhen auf der Bildung von mehreren Virulenzfaktoren. Die Virulenzfaktoren erleichtern beispielsweise die Adhäsion des Bakteriums an der Oberfläche von Zellwänden, die Invasion des Immunsystems und erhöhen die toxische Schädigung der Wirtszellen. *S. aureus* wurde sowohl innerhalb als auch außerhalb von Wirtszellen lebensfähig detektiert. Daher muss *S. aureus* die Opsonisierung, die durch einige Bestandteile des Komplementsystems und Antikörper auftritt, überwinden können. Andernfalls führt dies dazu, dass die Bakterien entweder direkt oder indirekt erkannt und durch Phagozytose eliminiert werden. *S. aureus* umgeht eine Opsonisierung und die anschließende Phagozytose durch Expression verschiedener Virulenzfaktoren (3). Neben den vielen bekannten Virulenzfaktoren sind hier insbesondere das Staphylococcus Protein A (*SPA*), das Fibronectin-bindende Proteine A und B (*FnbpA* und *FnbpB*), das Kollagen-bindende Protein (CPA) und der Clumping-Faktor A zu nennen, welche die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszellen unterstützen. Zu den Virulenzfaktoren gehören auch Exoproteine wie beispielweise Nukleasen, Proteasen, Lipasen und Hyalurindasen (4). Diese Proteine wandeln die Wirtsgewebe lokal Substanzen in Nährstoffe für das Bakterienwachstum um. Weiterhin wurde im Jahre 1932 erstmals das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) beschrieben, welches ein Zytotoxin ist und u.a. die starke Virulenz der Staphylokokken verursacht. Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) kann Gewebnekrosen hervorrufen und selektiv in die Membran der Leukozyten eindringen (5), daher ist er als Poren-formendes Toxin bekannt. Eine weitere wichtige klinische Manifestation von *S. aureus* ist die Produktion von Toxinen wie z.B. das toxische Shocksyndrom Toxin-1 (TSST-1) und die Staphylokokken-Enterotoxine. Es kann grundsätzlich festgestellt werden, dass die Pathogenität von Staphylokokken ein komplexer Prozess ist, an dem verschiedene extrazelluläre und zellwandständige Komponenten beteiligt sind, die abhängig vom Infektionsstadium erzeugt werden. Zu den Infektionsstadien gehört die Kolonisierung, die Vermeidung der Wirtsabwehr und die Entwicklung und Vermehrung mit der damit einhergehenden Ausbreitung (4).

1.1.3. Geschichte und Ausbreitung von MRSA

Staphylococcus aureus wurde erst im Jahr 1880 entdeckt und er ist seit dieser Zeit bis heute als ein potent pathologischer grampositiver Erreger bekannt. Das Bakterium kann eine Vielzahl von Infektionskrankheiten verursachen, welche in Bereichen von leichten Hautinfektionen bis hin zu schwerwiegenden postoperativen Wundinfektionen liegen können. Bevor Penicillin in den frühen 1940iger Jahren eingeführt und für die Behandlung der Infektionen eingesetzt wurde, lag die Sterblichkeitsrate der Patienten mit *S. aureus* Infektionen bei circa 80 %. Zwei Jahre nach der medizinischen Einführung des Penicillins, wurden im Jahr 1942 in Krankenhäusern die ersten Penicillin-Resistenzen beim Erreger festgestellt. Später wurden die resistenten Stämme sogar außerhalb von Krankenhäusern beobachtet. Im Jahre 1960 waren 80 % aller *S. aureus*-Stämme resistent gegen Penicillin. 1961, also zwei Jahre nach der Einführung von Methicillin in der Therapie, entwickelte *S. aureus* eine Resistenz gegen dieses Penicillinase-resistente Penicillin. Die Methicillin-Resistenz basiert auf dem Erwerb des *mecA*-Gens, welches für ein alternatives Penicillinbinde Protein (PBP2a) kodiert. In den nächsten Jahrzehnten haben sich unterschiedliche *S. aureus*-Klone weltweit in Krankenhäusern verbreitet, diese werden als sogenannte Hospital-assoziierte Methicillin-resistente *S. aureus*-Klone (*HA-MRSA*) zusammengefasst. Zusätzlich wurden im Jahre 1990 die virulenten Community-assoziierte MRSA-Klone (*CA-MRSA*) identifiziert, welche sich hauptsächlich in der Bevölkerung ausbreiteten und das Toxin Panton-Valentine Leukozidin (*PVL*) ausbilden (6). Zu Beginn überwiegen die *CA-MRSA*-Klone außerhalb von Krankenhäusern, heutzutage dehnen sie sich jedoch auch im Gesundheitswesen aus. Demzufolge kann man nun mehr keine klare Abgrenzung zwischen *CA-MRSA* und *HA-MRSA* Klone treffen. Weiterhin wurde in den frühen Jahren des 21. Jahrhunderts ein Schwein-assoziiertes MRSA-Stamm identifiziert, welcher den Sequenztyp 389 aufweist und dem klonalen Komplex CC389 (*clonalcomplex 389*) zugeordnet ist. MRSA-Klone des CC389 wurden erstmals in Schweinen und Schweinezüchtern entdeckt, später wurde er sowohl in weiteren Viehzuchtbeständen als auch in anderen Bevölkerungsgruppen nachgewiesen. Diese Entdeckung führte zur Entstehung eines weiteren MRSA-Teils, dem Livestock-assoziierte MRSA (*LA-MRSA*) (7). Nach aktuellen Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) ist ein weltweiter Rückgang von nosokomialen Infektionen in den Jahren 2007 bis 2012 zu beobachten.

Innerhalb Europas gibt es einen großen Unterschied bei den Resistenzraten von MRSA und im Vergleich zu den letzten Jahren, tritt ein dramatischer Rückgang der Prävalenz von nosokomialen *Staphylococcus aureus* Infektionen auf. Die Ursache für den Rückgang von

MRSA-Infektionen könnte auf die durchgeführten Interventionen zurückgeführt werden. Hier sind insbesondere der durch eingeschränkte Antibiotika Gabe entstandenen, verminderten Selektionsdruck auf den Erreger und die Reduktion der Ausbreitung virulenter Stämme zu nennen (8).

1.1.4. Resistenzmechanismus von MRSA

Die Mortalität der Patienten mit *S. aureus*-Infektionen lag vor der Einführung von Antibiotika bei etwa 80 %. Nachdem Penicillin in den frühen 1940iger Jahren in der medizinischen Versorgung eingesetzt wurde, hat sich die Prognose von Staphylokokken-Infektionen deutlich verbessert. Die ab dem Jahre 1942 beobachteten Penicillin-Resistenzen wurden durch das *blaZ*-Gen vermittelt. Dieses Gen kodiert für β -Laktamasen, wie z.B. der Penicillinase. Penicillinase spalten den β -Laktam-Ring des Penicillins und in der Folge wird das Antibiotikum inaktiviert. 1960 waren mehr als 80 % der Community- und der Hospital-assoziierten MRSA-Stämme resistent gegen Penicillin. Ab dem Jahre 1959 wurde Methicillin in Kliniken angewendet und zwei Jahre später gab es für Methicillin ebenfalls resistente *S. aureus*-Stämme.

Die Methicillin-Resistenz beruht hauptsächlich auf der Expression des *mecA*-Gens, welches sich innerhalb eines mobilen genetischen Elements, dem sogenannte Staphylococcus Cassette Chromosomemec (*SCCmec*), befindet. Das *SCCmec*-Element liegt in nahezu allen MRSA-Stämmen vor. Das *mecA*-Gen ist für die Synthese eines des Penicillin-binde Protein 2a (*PBP2a*) verantwortlich. *PBP2a* hat das native *PBP* substituiert und es dient als ein membranständiges Enzym, welches die Quervernetzung der Peptidoglykan in der bakteriellen Zellwand knüpft. Genauer katalysiert das *PBP2a* die Transpeptidierungsreaktionen der Peptidoglykan-Kette in der Bakterienzellwand. In Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika wird das ursprüngliche *PBP* aufgebrochen, folglich können die Zellwandkomponenten nicht mehr quervernetzt werden und das Bakterium stirbt ab. Da *PBP2a* eine verminderte Affinität gegen alle β -Laktam Antibiotika aufweist, können MRSA-Stämme, trotz hoher Konzentration dieser Antibiotika, überleben (9).

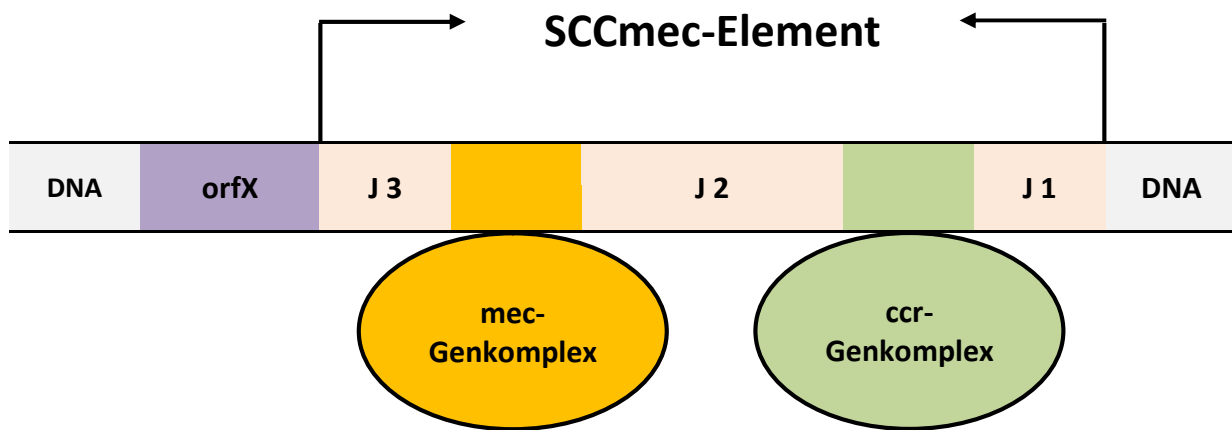


Abbildung 2: SCCmec-Element. Eine grafische Darstellung von SCCmec-Element und deren mec- und ccr-Genkomplexe, zusätzlich zeigt die Grafik der sogenannten J1, J2 und J3 Regionen innerhalb des SCCmec-Elements.

Zurzeit sind 11 Typen der *SCCmec*-Elemente bekannt. Ihre Einteilung beruht auf der Kombination zweier Komplexe, dem *mec*- und dem *ccr*-Genkomplex (*cassette chromosome recombinase-Genkomplex*). Weitere Strukturen des *SCCmec*-Elements sind die Insertionssequenzen (*IS*) und das Transposon (*Tn*). Diese befinden sich in Regionen außerhalb der *mec*- und *ccr*-Genkomplexe, nämlich den sogenannten *J*-Regionen (J1, J2 und J3). *J*-Regionen kodieren wahrscheinlich für weitere antimikrobische Resistenzen. In der Abbildung 2 wurden die *SCCmec*-Strukturen schematisch dargestellt. Insbesondere durch Polymorphismen und Variationen in den *J*-Regionen wurden die *SCCmec*-Typen weiterhin in Subklassen eingeteilt (10). Die *SCCmec*-Klassen 1 bis 10 tragen das *mecA*-Gen, wohin gegen die Klasse 11 ein *mecA*-Homolog trägt. Diese wird als *mecA_{LGA251}*- oder *mecC*-Gen bezeichnet. Molekulare Nachweismethoden bestätigen bislang noch nicht, inwieweit das *mecC*-Gen ebenfalls für eine β -Laktam Resistenz in *S. aureus* verantwortlich ist (11).

1.1.5. Die Genregulation der Resistenz von MRSA

Grundsätzlich gibt es drei Komponenten in dem Regulierungssystem welche die optimale Expression des *mecA*-Gens kontrollieren. Zu diesen zählen das Transducer-Molekül MecR1, der Repressor MecI und der Anti-Repressor MecR2. In Abwesenheit von β -Laktam Antibiotikum ist der membranständige Transducer MecR1 inaktiv und das Repressormolekül MecI bindet am *mecA*-Promotor. Sobald ein Antibiotikum im außerhalb der Zelle detektiert wird, kommt es zur autokatalytischen Spaltung von MecR1, was die Aktivierung einer Domäne zur Folge hat, welche Expression der Gene *mecA*, *mecR1*, *mecI* und *mecR2* induziert.

Das Anti-Repressormolekül MecR1 spaltet den Repressor dimer MecI und führt so zur Freilegung der Promotorregion der oben genannten Gene. Der MecI-Repressor wird dann durch eine Reihe von proteolytischen Enzymen im Zytoplasma inaktiviert. Die übrigen Moleküle werden wahrscheinlich vom zellulären Proteinumsatz degradiert (12). Es bleibt anzumerken, dass die genaue Signalkaskade der *mecA*-Genexpressionsregulierung bislang noch nicht bekannt ist. In Abbildung 3 wurde der Mechanismus von der Genregulation des MecA-Gens in einer Grafik von Arêde *et al.*, 2012 dargestellt.

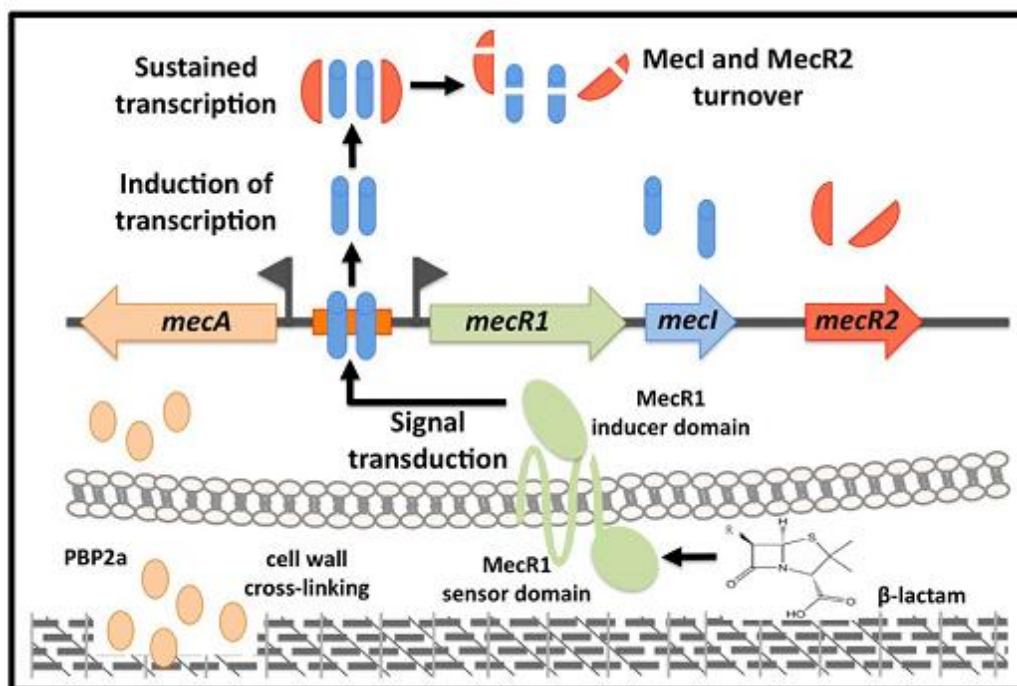


Abbildung 3: Resistenzmechanismus vom *mecA*-Gen. Die Bindung von β-Laktam-Antibiotika an bakteriellen Zellwand führt zur Aktivierung des Transducers MecR1 und folglich die *mecR1-mecI-mecR2* und *mecA*- Gene. Für eine optimale Expression des *mecA*-Gens, spaltet der Anti-Repressor MecR2 das Repressormolekül MecI, welches nun nicht mehr als Repressor der *mecA*-Expression fungiert. Die Synthese von PBP2a findet nun statt. Entnommen aus Arêde *et al.*, 2012.

1.1.6. Prävention und Therapie einer MRSA-Infektion

Die Therapie einer MRSA-Infektion kann sowohl lokal mit Antiseptika als auch systemisch mit Antibiotika erfolgen (13). Das ist abhängig davon, ob die Person entweder mit MRSA besiedelt ist oder sich bereits eine MRSA-Infektion ausgebildet hat. Die Begriffe Kolonisation oder Besiedlung, weisen darauf hin, dass die Person Träger von MRSA ist, ohne selbst erkrankt zu sein. Zunächst sollte immer auf die Behandlung einer möglichen MRSA-Kolonisation eingegangen werden. Hierbei könnte das MRSA-Screening Programm kolonisierten Menschen hilfreich sein. Das Programm ist in der Regel auf bestimmte Gruppen fokussiert, welche als Risiko-Gruppen bezeichnet werden. Zu diesen Gruppen zählen

Patienten und Personen aus medizinischen Einrichtungen, wie z.B. Rehabilitationskliniken und Pflegeheime, aber auch Dialysepatienten, Patienten mit bekannter MRSA-Infektion und Personen mit Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren, wie Schweine und Rinder, gehören dazu. Die Screening-Maßnahmen beinhalten hauptsächlich Abstriche, die aus häufigen besiedelten Körperregionen, wie den Nasenhöhlen, dem Rachen, dem Perineum, der Leiste und Hautdefekten (Wunden), genommen werden. Je nach Ort der Besiedlung, werden unterschiedliche Dekolonisierungsmaßnahmen durchgeführt. Für die Besiedlung des Nasenraums wird häufig eine Mupirocin-haltige Nasensalbe verschrieben. Kolonisationen des Rachenraums werden durch desinfizierende Mundspülungen, beispielsweise mit dem Wirkstoff Octenidin, behandelt. Bei einer Kolonisation der Haut werden verschiedene Lösungen, Seifen und Shampoos mit Chlorhexidin oder Mupirocin verwendet (13). Greifen diese Dekolonisierungsmaßnahmen nicht oder ist es bereits zu einer Infektion mit MRSA gekommen, sind in der Regel Antibiotika das richtige Mittel der Wahl. Hier sind zum einen Glykopeptide, wie z.B. Cotrimoxazole, Clindamycin, Fusidinsäure, Rifamycin, Erythromycin oder Aminoglykosiden, zu nennen. Glykopeptide als Antibiotika stellen die wichtigste therapeutische Reserve gegen MRSA-Stämme dar. Der Wirkmechanismus dieser Stoffe beruht auf der Hemmung des Zellwandaufbaus Grampositiver Bakterien, in dem die Bausteine für die Quervernetzung der Zellwand blockiert werden. Vancomycin ist ein besonders wichtiges Glycopeptid. Dieses Antibiotikum ist bereits seit 1955 bekannt und wurde erstmals 1980 im Rahmen der Suche nach wirksamen Alternativen gegen MRSA auf dieses Indikationsspektrum hin untersucht. Als wichtigste Nebenwirkungen ist die Oto-Nephrotoxizität, also die Schädigung von Ohren- und Nieren, zu erwähnen. Trotz seiner guten Erfolgsrate wurde für Vancomycin, aufgrund der häufigen Nebenwirkungen und wegen zunehmender Vancomycin-Resistenz, nach neuen Alternativen gesucht. Unter anderem wurde Teicoplanin 1989 als wirksames Antibiotikum für die klinische Behandlung von MRSA-Infektionen eingeführt. Teicoplanin wird aus dem Kulturfiltrat von *Actinoplanes teichomyceticus* gewonnen. Der Wirkmechanismus ist analog zu Vancomycin, weshalb auch gehäuft Kreuzresistenzen auftreten. Weiterhin gibt es auch Quinupristin, als erstes parental applizierbar Antibiotikum aus der Gruppe der Streptogramine. Der Wirkort von Quinupristin ist das Ribosom. Neu synthetisierte Proteine können das Ribosom nicht mehr verlassen, was u.a. zum Funktionsverlust lebenswichtiger Enzyme und letztendlich zum Absterben des Bakteriums führt (14). Eine weitere Alternative ist das Linezolid, welches zur Gruppe der Oxazolidinone gehört. Dieses Antibiotikum ist seit 2000 zugelassen und ist bereits in der Klinik erprobt. Linezolid wirkt durch Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese an der

50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Bislang ist Linezolid, es ist das einzige intervenös und oral verabreichbare Antibiotikum gegen MRSA. Bekanntermaßen sind MRSA-Keime bereits gegen viele Antibiotika resistent. Eine erfolgreiche Therapie für MRSA-Infektionen wird zumeist durch spezielle Kombinationen verschiedener Antibiotika erreicht. Die Auswahl der Antibiotika hängt dabei vom Ergebnis des Antibiogramms ab. Ein Antibiogramm zeigt gegenüber welchem Antibiotikum ein Bakterium resistent bzw. sensible ist. Ein Antibiogramm wird mit Hilfe eines Agardilutionstests erstellt. Hierbei werden zwei oder mehrere Konzentrationen eines Antibiotikums hinsichtlich ihrer Wirkung auf einen bestimmten MRSA-Abstrich getestet. Je nach Inkubationszeit stirbt das Bakterium bei bestimmten Antibiotika-Klassen und -konzentrationen ab bzw. vermehrt sich trotz des Vorhandenseins des Antibiotikums, da die Konzentration des Antibiotikums zu niedrig ist. Anschließend werden die sogenannten Hemmhöfe, also der Bereich in dem das Bakterium nicht überlebensfähig ist, gemessen und das Ergebnis beurteilt. Darüber hinaus sind andere Verfahren, wie die Mikrodilutionsmethode und automatisierte Resistenzbestimmungen, möglich.

1.1.7. Nachweismethoden für MRSA

Konventionelle, kulturbasierte Nachweismethoden sind die derzeitigen Goldstandards zur Detektion von MRSA. Hierfür erfolgt, nach Anzucht der zu untersuchenden bakteriellen Probe in einer Primär-Kultur, zumeist ein Resistenztest, welcher entweder als Agardiffusionstest oder mit Hilfe eines automatisierten Systems durchgeführt wird. Je nachdem ob ein Anreicherungsschritt durchgeführt werden muss oder nicht, dauern kulturbasierte Methoden bis zum Vorliegen des Endergebnisses etwa 1 bis 3 Tage. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren vermehrt Verfahren zur schnellen Bestätigung einer Antibiotika-Resistenz entwickelt. Hierzu zählen vor allem Anzucht von MRSA auf chromogenen Selektivnährmedien, der PBP2a-Latex-Agglutinationstest und PCR-basierte Methoden. Grundsätzlich können die oben genannten Methoden zwar die Identifikation der Methicillin-Resistenz beschleunigen, aber nicht die notwendigen Bebrütungszeiten verkürzen. Demnach haben solche Ansätze nur einen Beschleunigungseffekt von maximal einem Tag. Daher wurden Verfahren entwickelt, bei denen entweder die Primär-Kultur komplett entfällt, wie z.B. bei einigen PCR-basierten Verfahren, oder bei denen die Kulturzeiten wesentlich kürzer ausfallen beispielsweise durch Schnellkultur-Verfahren. Ein verfügbares Schnellkultur-Verfahren ist der BacLite Rapid MRSA Test der Firma M3 Company. Die Detektion von MRSA basiert hier auf der Messung der Adenylatkinase-Aktivität des

Bakteriums und wird nicht, wie im Vergleich zu traditionellen Verfahren, auf ein makroskopisch sichtbares Wachstum hinuntersucht. Beim BacLite Rapid MRSA-Test werden die *S. aureus*-Zellen nach kurzer Inkubation in einer Selektivbouillon, welche Cefoxitin, Ciprofloxacin und Colistin enthält, vorangereichert und anschließend immunmagnetisch getrennt und mittels Lysostaphin aufgeschlossen. Danach wird durch Biolumineszenz-Messung die Adenylatkinase-Aktivität detektiert (15). Derzeit gibt es nur wenige Daten, die in klinischen Evaluierungsstudien oder im Vergleich zu anderen Methoden gewonnen wurden, so dass eine abschließende Bewertung noch nicht möglich ist. PCR-basierte Verfahren ermöglichen dagegen den Direktnachweis von MRSA aus Abstrich-Materialien, d. h. eine ohne Primär-Kultur durchführen zu müssen. Demzufolge können kurze Ablaufzeit von 1 – 5 Stunden erreicht werden. Eine verlässliche Detektion der Methicillin-Resistenz erfolgt durch den Nachweis des *mecA*-Gens, dessen Genprodukt das PBP2a ist, welches für die Methicillin-Resistenz verantwortlich ist. Da das *mecA*-Gen nicht nur im *S. aureus*- Genom, sondern auch mit hoher Frequenz im Genom von Koagulase-negativen Staphylokokken wie *S. epidermidis*, *S. hämolyticus* vorkommt, ist bei einer Mischbesiedlung, welche z. B. typischerweise in der Nasenschleimhaut auftritt, die Aussagekraft eines positiven Ergebnisses der PCR von *mecA* stark beschränkt. Deswegen muss auch hier ein positives Ergebnis immer kulturell überprüft werden. Einen weiteren wichtigen Entwicklungsschritt stellen die PCR-Systeme dar, welche außerhalb eines Labors verwendet werden können. Hierzu zählen BD GeneOhm-MRSA von Becton Dickinson (Québec, Kanada), GeneXpert-MRSA von Cepheid (Sunnyvale, USA), GenzymeVirotech (Brescia, Italien), GenoType-MRSA Direkt von Hain Lifesciences (Nehren, Dtl.) und Lightcycler Staphylococcus-MRSA Kit von Roche Diagnostics (Branchburg, USA) (15). Diese Real-Time-PCR-basierten Systeme stehen derzeit als ausgereifte kommerzielle Systeme zur Verfügung. Die Anwendung dieser Systeme kann teilweise innerhalb einer Stunde abgeschlossen sein. Auch hier sollte ein positiver PCR-Befund kulturell bestätigt werden, um falsch positive Ergebnis zu erkennen. Die verwendete Methode sollte demnach mit Bedacht ausgewählt werden, da eine sequentielle Bearbeitung, die erst aus dem Schnell-Test, dann aus der Kultur besteht, zu Verzögerungen bei der Ermittlung einer geeigneten Therapie führen kann. Jedoch ist zu erwähnen, dass bei PCR-basierten Methoden falsch negative Ergebnisse sehr selten sind, daher sind sie für den Ausschluss einer Infektion mit MRSA sehr gut geeignet. Das Aufkommen neuer MRSA-Stämmen, mit veränderter SCCmec-Sequenz, kann mit diesen Schnell-Test-Systemen nicht erkannt werden, da eine Amplifikation mit spezifischen Primern hier immer nur von bereits

bekanntesten Sequenzen möglich ist. Derzeit ist die Kultur das Goldstandard-Verfahren zum Nachweis von MRSA (15) (16) (17) (18) (19).

1.2. Prinzip einer Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um die so amplifizierte Genfragmente auf einem DNA-Microarray zu hybridisieren. Die PCR ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen innerhalb einer DNA-Sequenz. Anfang der 70er Jahre ist der Norweger Kjell Klepp erstmals auf den Gedanken gekommen DNA durch zwei flankierende Primeren zu Vervielfältigung. Jedoch wurde die PCR als anwendbare Methode erst 1983 von Kary Mullis etabliert. Seine Idee war es, ein neues DNA-Syntheseverfahren zu entwickeln, bei der die DNA in mehreren Zyklen mittels eines Enzymes, einer DNA-Polymerase, vervielfältigt wird. Nachdem die gDNA aus dem Untersuchungsmaterial isoliert wurde, erfolgten die grundsätzlichen Schritte der PCR-Methode.

Die PCR sind heute meist vollständig automatisiert, dadurch befinden sich alle notwendigen Komponenten und Hilf-Komponenten in einem Reaktionsgefäß, wobei der Verlauf der Amplifikation über ein sich wiederholendes Temperatur-Programm gesteuert wird. Am Anfang wird die DNA auf 90 - 95 °C erhitzt, womit sich die Wasserstoffbrücken Bindungen zwischen die komplementären Basen aufgelöst werden, dieser Schritt wurde als Denaturierung der DNA bekannt. Anschließend wird die Reaktion auf eine Temperatur von 50 - 60 °C abgekühlt. Die geringfügig unter der Schmelz-Temperatur der verwendeten Primer liegen sollte, ab jetzt können sich die kurzen komplementären Oligonukleotiden (Primer) an die 3' Ende der Einzelstränge DNA anlagern. Im dritten Schritt erfolgt die Elongation der DNA-Sequenz, bei der wird die Temperatur wiederum erhöht, in der Regel auf 65 - 72 °C, da bei dieser Temperatur die Polymerase besonders aktiv ist und beginnt durch die Primer eine Kopie der charakteristischen DNA-Sequenz in der 5'-3' Richtung aufzubauen.

Eine der ersten thermostabilen DNA-Polymerase wurde aus dem lebenden thermophilen Bakterium der *Thermus aquaticus* gewonnen und als *Taq*-Polymerase bekannt ist. Danach wurde erneut die Temperatur auf 95 °C erwärmt, wodurch die amplifizierte Sequenz von der Ursprung DNA abgelöst wird und nun ihrerseits als Vorlage dienen kann, um eine weitere Kopie zu produzieren (20).

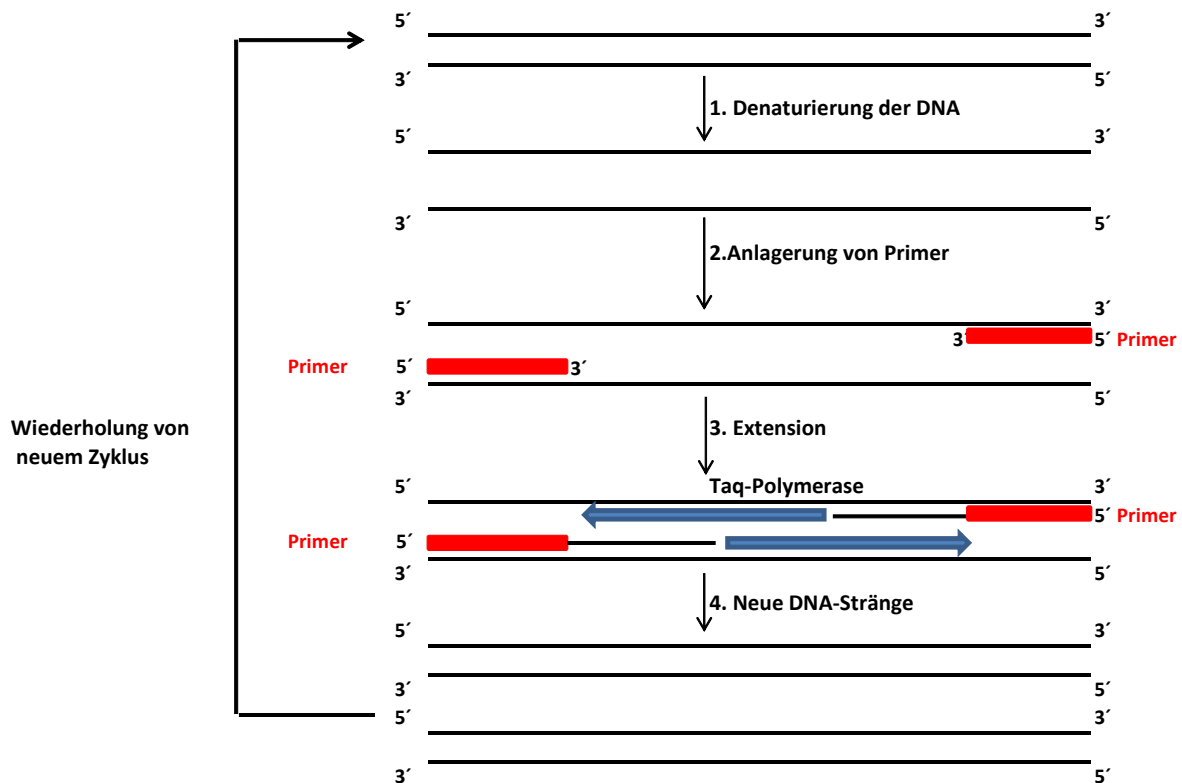


Abbildung 4: Prinzip einer PCR. Der Thermalzyklus einer PCR besteht aus der Denaturierung der DNA-Strängen, Anlagerung der Primer an 3' Ende und Verlängerung von Primer durch *Taq*-Polymerase in der Richtung 5' - 3'. Abschließend dienen die neuen DNA-Stränge selbe als Vorlage für die Amplifikation von weiterer DNA-Menge.

1.2.1. Optimierung einer Multiplex-PCR

Grundsätzlich kann man mit Hilfe eines Multiplex PCR-Ansatzes mehrere gezielte Gensequenzen gleichzeitig amplifizieren. Das wird durch die Zusammensetzung von mehreren Primerpaaren angestrebt. Die Vorteile von Multiplex-PCR sind die Zeit und Anstrengung der Arbeit innerhalb des Labors sowie die Kosten zu reduzieren. Die Effektivität einer Multiplex-PCR basiert jedoch auf dem optimalen Zusammenspiel der unterschiedlichen PCR-Komponenten. Eine erfolgreiche Multiplex-PCR ist hauptsächlich von den Anlagerungs- und Elongationsraten der Primerpaare abhängig. Außerdem zählt die Anlagerungstemperatur neben dem Primerdesign zu den limitierenden Faktoren einer Multiplex-PCR. Die verwendeten drei Primerpaare und deren geeignete Anlagerungstemperaturen wurden am Fraunhofer IZI-BB zuvor über ein webbasierte Analyse Tool (Tool von NEB: *New England BioLabs*) überprüft und ermittelt. Die Anlagerungstemperaturen der verwendeten Primer waren nach dieser Bearbeitung 50 °C für 16S-rDNA-Gen und 44 °C für 23S-rDNA- und *mecA*-Gen. Hier ist es noch wichtig zu erwähnen, dass eine Temperatur von 45 °C statt 44 °C für 23S-rDNA und *mecA*-Gen herangezogen wurde. Die Primerpaare sollen ebenfalls in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, da durch eine erhöhte Primer-Menge die

Amplifikation besonders bei dem großen Genfragment (23S-rDNA) viel verbessert wird. Darüber hinaus ist die Elongationsrate der Primer von der Aktivität der *Taq*-Polymerase abhängig. Weitere essentielle PCR-Komponenten sind dNTPs (Deoxyribonukleoside-Triphosphat) und die DNA Sequenz, welche eine wichtige Rolle für die PCR-Methode spielt. Die Optimierung einer Multiplex-PCR weist häufig mehrere Schwierigkeiten und Herausforderungen auf, welche sich entweder durch die geringe Sensitivität oder wenige Ausbeute Spezifität und die Amplifikation der bevorzugte spezifische DNA Sequenzen erscheinen. Die Anwesenheit von mehreren Primerpaaren in einer PCR-Reaktion führt oft zum Auftreten einer ungewünschten Fehlpaarung der Primerpaare und somit zum falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnis. Die Optimierung einer Multiplex-PCR sollte sich zu der Verminderung derartiger unerwünschter Produkte gerichtet werden (21). Hier wurden die drei Genfragmente (23S-rDNA mit 1840 bp, 16S-rDNA mit 1485 b und *mecA*-Gen mit 364 bp) gleichzeitig durch eine Multiplex-PCR amplifiziert, um die Hybridisierung der Bakterien-DNA auf einem Microarray zu ermöglichen. In diesem Fall ist eine höhere Spezifität erforderlich, von daher wird hier eine zuverlässigere Methode für Multiplex-PCR durchgeführt.

Zu Beginn wurden die gezielten Komponenten durch Temperaturen in Höhe von 95 °C für 15 Minuten erhitzt, damit die verwendete HotStar*Taq*-Polymerase von Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) aktiviert wird. Das HotStar*Taq*-Polymerase-Enzym hat eine spezifische HotStar-Aktivität, welche das Enzym während des Reaktionsaufbaus verhindert und beginnt nur nach dem genannten anfänglichen Aktivierungsschritt bei 95 °C zu arbeiten. Zusätzlich wird bei diesem Aktivierungsschritt auch die nicht-spezifische angelagerte Primer denaturiert und sorgt für eine hoch spezifische Amplifikation. Als nächstes wurde die DNA durch eine Temperatur von 95 °C denaturiert. Dann erfolgte die Anlagerung von der Primer bei einer Temperatur von 50 °C die Temperatur wurde anschließend wieder auf 68 °C erhöht, was zu einer Verlängerung der Primer in Richtung 5'-3' kommt. Die Menge von *Taq*-Polymerase sollte immer für die Reaktion ausreichend eingesetzt werden, damit sie auf diese Weise den Reaktionsverlauf und die Ausbeute nicht vermindern kann. Die *Taq*-Polymerase sollte ausreichend sein, um 10 nmol dNTPs bei 68 °C zu inkorporieren. Außerdem benötigt die Polymerase MgCl₂ Ionen als Kofaktor, welcher der verlässliche Einbau von dNTPs durch die Polymerase ermöglichen. Die MgCl₂ Ionen können in einer hohen Konzentration infolge ihrer geringen Spezifität die Ausbeute absenken, weil sie die Wahrscheinlichkeit von den Fehlpaarungen erhöhen können.

Das PCR-Programm ist zuerst verstellt, in dem der Zyklus der Vervielfältigung 40-mal wiederholt wird, was es zur Erzeugung einer ausreichenden Menge von Ziel-DNA kommt. Um die Detektion von erfolgreicher Ziel-DNA- und Sonden-Bindung nach der Hybridisierung und beim Scannen der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde hier die Methode von Fluoreszenzmarkierungs-PCR durchgeführt. Abschließend wurden die SONDENSIGNALE auf einem Microarray mittels einer Laser-Scanning-Mikroskopie optisch ausgelesen.

1.3. DNA-Microarray

Die Analyse durch DNA-Microarray ist in den letzten Jahren eben noch auf den Wissenschaftsgebieten aufgekommen. Sie scheint als ein flexibles Verfahren der mikrobiologischen Diagnose, um die Vielzahl von Nukleinsäure-Fragmenten gleichzeitig und schnell zu analysieren. Ein Microarray besteht grundsätzlich aus bestimmten Oligonukleotiden-Sequenzen, welche auf einem Objektträger immobilisiert sind und als sehr kleine Spots oder was sogenannte rasterförmig auf einem Objektträger aufgebracht werden. Jeder Spot ist als eine Sonde bezeichnet. Die Sonden können mittels verschiedener Methode gewonnen werden und ebenso gibt es unterschiedliche Methode, um die Sonde auf einem Array unterzubringen. Die Größe der Sonden variiert von einem System zu anders, aber sie misst in der Regel voraussichtlich weniger als 200 μm im Durchmesser. Ein Objektträger wurde aus unterschiedlichen Werkstoffen z.B. Glas oder Kunststoff hergestellt und er dient als solide Ebene, auf der bis 10,000 Sonden im kleinen Gebiet von weniger Quadratzentimeter immobilisiert werden können (22). Im Zuge der Experimente werden die Sonden mit Hilfe eines Nicht-Kontakt-Spotverfahren auf einem Glas Objektträger gedruckt. Zunächst wird ein Objektträger mit Epoxy-Gruppen beschichtet, um eine Kovalente Bindung zwischen die Ziel-DNA und ein Objektträger zu begünstigen. Es ist denn infolge dessen nötig, alle nicht gespotteten Epoxy-Gruppen mit Hilfe eines Blocken-Ansatzes vor Hybridisierung zu inaktivieren, ansonsten können die DNA-Fragmente nicht nur die komplementären Sonden binden, sondern auch mit den reaktiven Epoxy-Gruppen überall auf dem Objektträger verknüpft werden. Jeder Spot beim hier verwendeten Array ist 400 μm von dem nächstgelegenen Spot entfernt. Außerdem wird jeder Sonde im Rahmen der Steigerung von der Sensitivität zweimal gespottet. Der Grund dafür ist, dass es sich bei den Sonden um kurze Oligonukleotidensequenzen mit geringer Sensitivität handelt. Grundsätzlich weist jede Sonde auf eine spezifische Sequenz hin und wird daher nur an der komplementären DNA-Sequenz gebunden. Um den räumlichen Effekt oder die sogenannte Sterisch-Hinderung der langen DNA-Fragmente in der Nähe vom Objektträger zu vermeiden, wurde hierbei die DNA vor

dem Hybridisierungsschritt unspezifisch in kleinen DNA-Fragmente verdaut. Infolge dieses Schrittes wird eine effiziente DNA- und Sonden-Bindung eingegangen. Weiterhin wurde durch den Verdau-Schritt die Verdrängung reduziert, die durch starke Bindung der langen Doppelhelix-Stränge einer Ziel-DNA vorkommt. Diese kann zur Störung einer gezielten komplementären Bindung zwischen der Ziel-DNA und der Sonde führen.

Nach den Schritten der Hybridisierung- und des Waschens werden die DNA- und die Sonden-Bindung als ein Fluoreszenzsignal ausgelesen. Der Farbstoff Dy647P1 von der Firma Dyomics wurde hier eingesetzt. Er hat die Vorteile, im Gegensatz zu den klassischen Farbstoffen wie z.B. Cy5, dass er relativ kostengünstig ist und dem Spektrum von Cy5 stark ähnelt. Das Auslesen erfolgt dabei mit Hilfe einer Laser-Scanning-Mikroskopie (GenePix-Scanners), welcher den Fluoreszenz-Farbstoff bei einer Wellenlänge von 635 nm anregen kann und demzufolge das emittierte Licht scannt. Die Stärke des erzeugten Signals ist abhängig davon, wie viele markierte DNA-Fragmente an der Sonde gebunden sind. In Abbildung 5 wurden die Ablaufschritte einer Microarray-Probe zusammengefasst.

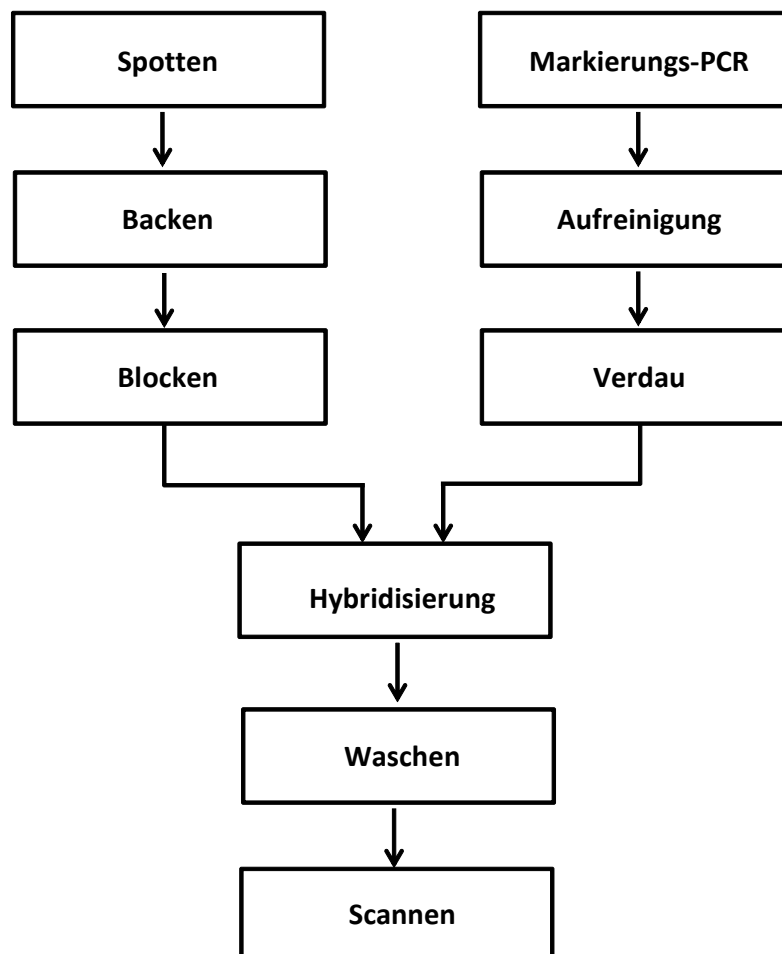


Abbildung 5: Ablauf einer DNA-Microarray mikrobieller Probe.

1.3.1. Prinzip von Sonden

Die Sonden wurden am Fraunhofer Institut mit Hilfe einer Software, der ARB Silva-Software, konzipiert (23). Es handelt sich um Oligonukleotiden-Sequenzen, die nur 20 bis 50 Nukleotiden aufweisen. Die Sensitivität kann wesentlich durch die Verwendung längerer Sonden erhöht werden, gleichzeitig sinkt dabei aber die Spezifität. Die kurzen Sonden sind dagegen spezifischer als lange Sonden und erlauben unter optimalen Bedingungen auch die Unterscheidung von einzelnen Nukleotiden-Polymorphismen. Aus diesem Grund wurde hier jede Sonde zweimal auf dem Array gespottet. Des Weiteren ist praktikabel pro Erreger und Erregerspezies mehr als eine spezifische Sonde zu entwickeln, da es zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität eines Microarrays kommen kann. Zusätzlich wurde festgestellt, wenn die Sonden im direkten Kontakt mit dem Objektträger angebracht werden, können die Ziel-DNA und die Sonden nicht optimal hybridisieren. Deswegen werden hier sogenannte Spacer oder Abstandhalter verwendet. Es handelt sich hierbei um eine kurze Nukleotiden-Sequenz, die etwa aus 13 Thyminbasen stammt. Der Spacer wird an das 5'-Ende der Sonden-Sequenz angebracht. Ein weiterer kritischer Parameter beim Design der Sonden ist die Uniformität der Sonden hinsichtlich des Hybridisierungsverhaltens. Dies kann hauptsächlich mit einheitlichen Struktureigenschaften, wie Länge der Sonden, GC-Gehalt, Schmelztemperatur und Bindungskapazität erreicht werden. Beim Sonden-Design ist wichtig zu beachten, dass die Schmelztemperaturen der allen verwendeten Sonden etwa im gleichen Bereich sind, welcher oberhalb der ausgewählten Hybridisierungstemperatur liegen muss. Weil ein kompletter Schmelz der Ziel-DNA kann zur Verhinderung der Anlagerung an die Sonde und der Hybridisierung führen. Die Schmelztemperaturen sind von GC-Gehalt der Sonden-Sequenz abhängig. Um die Hybridisierung zu unterstützen, wurde weiterhin ein definierter Salzgehalt eingesetzt. Dies reduziert die Stringenz, d.h. dass das Bestreben der DNA-Stränge sich nur exakt komplementär an einander zu binden und ermöglicht es denn die Hybridisierung der Ziel-DNA mit der Sonde. Die Verwendung von hoher Salzkonzentration kommt zur Beschleunigung der Bindung von komplementären Strängen und erhöht daher die Wahrscheinlichkeiten für Fehlpaarungen. Aus diesem Grund wurde ein Wasch-Protokoll mit vermindertem Salzgehalt etabliert. Die Waschschrte erfolgen unverzüglich nach dem Hybridisierungsschritt und sie können unspezifische gebundene DNA-Stränge von der Array beseitigen. Abschließend wird die Ziel-DNA, die nur exakt komplementär gebunden ist auf DNA-Microarray detektiert.

1.3.2. SNP- und Nicht SNP- Sonden

Als Single Nucleotide Polymorphism, kurz SNP, werden in der Genetik verschiedene Variationen einzelner Basenpaare innerhalb eines DNA-Strangs bezeichnet. Einzelnukleotid Polymorphismen oder Punktmutationen eignen sich vergleichsweise zu anderen Polymorphismen aufgrund ihrer niedrigen Mutationsrate und häufigem Vorkommen im kompletten Genom in besonderer Maße für Assoziationsanalysen und Identifikation von komplexer Krankheiten und Infektionen. Der größte Vorteil jedoch liegt darin, dass eine Vielzahl von SNP-Sonden, die bis eine Million sein kann, gleichzeitig auf DNA-Mikroarray bestimmt werden können. Dies ist auch der Grund, weshalb derartigen Analysen relativ kostengünstig durchführbar sind. Hierbei wurde für die Detektion von Bakterien-Stämme durch die SNP-Sonde bestimmter Genbereich *in Silico* gesucht, der sich durch eine Punktmutation unterscheidet. Diese Punktmutation ist für diesen Stamm spezifisch und wird daher für die Identifikation des Stamms verwendet. In dieser Arbeit unterscheidet man zwischen SNP- und Nicht SNP-Sonden, wobei jeder SNP-Sondensatz aus vier fast identischen Sonden besteht. Die einzelne Sonde eines Ansatzes unterscheidet sich dabei nur in einer Base (A, T, C oder G) von den restlichen drei Sonden. Nach dem scannen und bei der Auswertung und Bearbeitung von Daten wird die Sonde, die dem stärksten Signal gezeigt hat, als *perfect match* (PM) bewertet und bzw. werden die übrigen drei Sonde als *miss match* (MM) bewertet. Darüber hinaus wird der MM-Sonde, die dem stärksten Signal gegeben hat, als maximaler MM (MM_{Max}) bezeichnet (24). Im Unterschied zur SNP-Sonden weisen die Nicht SNP-Sonden keine Sondensätze auf. Jede Nicht SNP-Sonde bindet am komplementären Sequenz der DNA (Ziel-DNA) und lässt sich danach durch die Intensität ihres Signals mittels zwei spezifischer Kontrollkriterien bewerten. Diese Erläuterung von SNP-Sonden und Nicht-SNP-Sonden wird später notwendig sein, damit man die festgelegten charakteristischen Kontrollkriterien für Bearbeitung und Auswertung die Ausbeute auffassen kann.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit richtet sich auf die Unterscheidung von MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) Stämme und MSSA (Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*) Stämme durch die Identifizierung und das Nachweis vom Resistenzgen (*mecA*-Gen). Außerdem werden *Staphylococcus aureus*-Stämme von anderen Koagulase-negativen Staphylokokken z.B. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hämolyticus*, *Staphylococcus hominis* und *Staphylococcus saprophyticus* sowie von anderen relevanten Stämmen über die 16S-rDNA und 23S-rDNA Gene unterschieden. Hierfür werden, um das

Ziel zu erreichen, insgesamt 166 der total 200 Staphylokokken-Stämmen vom RKI (Robert-Koch-Institut) untersucht. Mit Hilfe einer optimierten Multiplex-PCR und der Verwendung von DNA-Microarray werden Gesamtaufwand und Kosten der Arbeit so gering wie möglich angestrebt und gleichzeitig zuverlässige Ergebnisse mit hoher Spezifität und Sensitivität erzielt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Staphylokokken-Stämme vom RKI

Während dieser Dissertation wurden exakt 166 unterschiedliche Staphylokokken Stämme auf einem Mikroarray getestet, die gemeinsam von Robert-Koch-Institut entweder als Cryobank-Gefäße oder als Glycerol-Stocke vorhanden sind. Die Stämme sind bereits vom RKI durch bestimmte externe Nummerierung gekennzeichnet, so dass auch jeder Stamm mit Hilfe dieser Nummerierung neben der Interne Nummerierung von 1 bis 200 von Fraunhofer IZI-BB identifiziert wird.

Tabelle 1: Staphylokokken-Stämme. 166 Stämme von RKI mit eigener Enumeration, Herkunftsort und dazugehörigen Stammcharakteren.

Nr.	Isolate	Spezies	Bundesland	Spa-Lokus	CC-Lokus	MH K OXA	Phänotypische OXA Interpretation (EUCAST)	mec A	mec C
12	12-00712	<i>S. aureus</i>	Hessen	t587	ST9	1	sensitive	-	Nd
15	12-00962-	<i>S. aureus</i>	Sachsen	t608	CC22	1	sensitive	-	-
16	12-00966	<i>S. aureus</i>	Hamburg	t159	CC121	1	sensitive	-	Nd
20	12-01152	<i>S. aureus</i>	Baden-Württemberg	t084	ST15	0,5	sensitive	-	Nd
23	12-01207	<i>S. aureus</i>	Mecklenburg-Vorpommern	t084	ST15	0,25	sensitive	-	Nd
24	12-01244-	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t008	CC8	0,25	sensitive	-	Nd
26	12-01401	<i>S. aureus</i>	Sachsen-Anhalt	t091	ST7	0,25	sensitive	-	Nd
28	12-01476	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t127	ST1	0,25	sensitive	-	Nd
34	12-01856-	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t688	CC5	0,25	sensitive	-	Nd
36	12-01970	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t024	CC8	0,25	sensitive	-	Nd
37	12-02020	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t021	CC30	0,25	sensitive	-	Nd
40	12-02116	<i>S. aureus</i>	Bremen	t005	CC22	0,25	sensitive	-	Nd
53	12-02373	<i>S. aureus</i>	Hamburg	t1252		1	sensitive	-	Nd
60	12-02470	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t608	CC22	4	resistant	-	-
61	12-02519	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t032	CC22	1	sensitive	-	Nd
62	12-02603	<i>S. aureus</i>	Baden-Württemberg	t012	CC30	0,5	sensitive	-	Nd
65	12-02736	<i>S. aureus</i>	Sachsen -Anhalt	t843	ST130	4	resistant	-	+
70	12-02776	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t272	CC121	0,5	sensitive	-	Nd
80	12-02835	<i>S. aureus</i>	Bayern	t005	CC22	1	sensitive	-	nd
91	12-02890-	<i>S. aureus</i>	Sachsen-Anhalt	t084	ST15	1	sensitive	-	nd
93	12-02923	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t338	CC30	1	sensitive	-	nd
94	12-02929	<i>S. aureus</i>	Hessen	t230	CC45	2	sensitive	-	-
99	12-02967	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t015	ST15	1	sensitive	-	nd
106	12-03133	<i>S. aureus</i>	Mecklenburg-W	t078	ST7	1	sensitive	-	-
113	12-03208	<i>S. aureus</i>	Bremen	t3625	CC398	1	sensitive	-	nd
118	12-03280	<i>S. aureus</i>	Bayern	t021	CC30	1	sensitive	-	nd
119	12-03283	<i>S. aureus</i>	Rheinland-Pfalz	t608	CC22	1	sensitive	-	-
120	12-03287	<i>S. aureus</i>	Bayern	t709	CC22	1	sensitive	-	nd

121	12-03289-	<i>S. aureus</i>	Sachsen	t1112		2	sensitive	-	-
133	12-03465	<i>S. aureus</i>	Baden-Württemberg	t091	ST7	1	sensitive	-	nd
136	12-03487	<i>S. aureus</i>	Baden-Württemberg	t1151	ST59	4	resistant	+	-
137	12-03488	<i>S. aureus</i>	Baden-Württemberg	t1151	ST59	0,5	sensitive	-	-
140	12-03493	<i>S. aureus</i>	Bremen	t021	CC30	0,5	sensitive	-	nd
147	12-03675	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t005	CC22	1	sensitive	-	nd
155	12-03875	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t084	ST15	0,25	sensitive	-	nd
156	12-03888	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t002	CC5	0,25	sensitive	-	nd
157	12-03917	<i>S. aureus</i>	Bayern	t100		0,5	sensitive	-	nd
161	12-04017	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t026	CC45	0,5	sensitive	-	nd
162	12-04481	<i>S. aureus</i>	Berlin-Brandenburg	t571	ST398	0,25	sensitive	-	nd
52	12-02369	<i>S. aureus</i>	Schleswig-Holstein	t011	CC398	4	resistant	+	nd
58	12-02459	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t091	ST7	0,5	sensitive	-	nd
59	12-02462	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t608	CC22	1	sensitive	-	-
66	12-02743	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t843	ST130	2	sensitive	-	+
71	12-02794	<i>S. aureus</i>	Hessen	t7914	ST261	4	resistant	-	+
72	12-02797	<i>S. aureus</i>	Sachsen	t843	ST130	1	sensitive	-	+
75	12-02813	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t003	ST225	4	resistant	+	nd
77	12-02823	<i>S. aureus</i>	Hessen	t002	CC5	4	resistant	+	nd
79	12-02831	<i>S. aureus</i>	Schleswig-Holstein	t001	ST228	4	resistant	+	nd
81	12-02846	<i>S. aureus</i>	Hamburg	t032	CC22	4	resistant	+	nd
82	12-02848	<i>S. aureus</i>	Rheinland-Pfalz	t003	ST225	4	resistant	+	nd
83	12-02850	<i>S. aureus</i>	Rheinland-Pfalz	t014	CC5	4	resistant	+	nd
86	12-02875	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t3391	ST236	4	resistant	-	+
87	12-02877	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t003	ST225	4	resistant	+	nd
88	12-02882	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t015	CC45	4	resistant	+	Nd
90	12-02888	<i>S. aureus</i>	Schleswig-Holstein	t294	CC22	4	resistant	+	Nd
92	12-02895	<i>S. aureus</i>	Schleswig-Holstein	t032	CC22	4	resistant	+	Nd
95	12-02948	<i>S. aureus</i>	Sachsen -Anhalt	t032	CC22	4	resistant	+	Nd
97	12-02955	<i>S. aureus</i>	Hessen	t008	CC8	4	resistant	+	Nd
98	12-02962	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t032	CC22	4	resistant	+	Nd
100	12-02974	<i>S. aureus</i>	Hessen	t032	CC22	4	resistant	+	Nd
101	12-03008-	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t003	ST225	4	resistant	+	Nd
102	12-03080	<i>S. aureus</i>	Schleswig-Holstein	t044	ST80	4	resistant	+	Nd
103	12-03094	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t003	ST225	4	resistant	+	Nd
105	12-03101	<i>S. aureus</i>	Hessen	t657	ST772	4	resistant	+	Nd
107	12-03135	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t034	CC398	4	resistant	+	Nd
109	12-03148	<i>S. aureus</i>	Nodrhein-Westfalen	t037	ST239	4	resistant	+	Nd
110	12-03171	<i>S. aureus</i>	Sachsen-Anhalt	t843	ST130	4	resistant	-	+
114	12-03218	<i>S. aureus</i>	Sachsen	t032	CC22	4	resistant	+	nd
115	12-03225	<i>S. aureus</i>	Hamburg	t1736	ST130	4	resistant	-	+
122	12-03290	<i>S. aureus</i>	Sachsen	t1112	ST130	4	resistant	-	+
123	12-03291	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t032	CC22	4	resistant	+	nd
125	12-03306	<i>S. aureus</i>	Mecklenburg-Vorpommern	t019	CC30	4	resistant	+	nd
126	12-03325	<i>S. aureus</i>	Sachsen -Anhalt	t020	CC22	4	resistant	+	nd
138	12-03489	<i>S. aureus</i>	Sachsen -Anhalt	t843	ST130	4	resistant	-	+
139	12-03490	<i>S. aureus</i>	Sachsen -Anhalt	t032	CC22	4	resistant	+	nd
141	12-03546	<i>S. aureus</i>	Niedersachsen	t003	ST225	4	resistant	+	nd
143	12-03553	<i>S. aureus</i>	Nordrhein-Westfalen	t022	CC22	4	resistant	+	nd

2	12-00322	<i>S. epidermidis</i>	Niedersachsen			4	resistant	nd	nd
6	12-00389	<i>S. epidermidis</i>	Nordrhein-Westfalen			4	resistant	+	nd
8	12-00408	<i>S. epidermidis</i>	Hamburg			4	resistant	+	nd
17	12-01000-	<i>S. epidermidis</i>	Schleswig-Holstein			0,5	sensitive	nd	nd
29	12-01536	<i>S. epidermidis</i>	Sachsen-Anhalt			4	resistant	+	nd
30	12-01538	<i>S. epidermidis</i>	Sachsen-Anhalt			4	resistant	+	nd
32	12-01631	<i>S. epidermidis</i>	Bayern			4	resistant	nd	nd
33	12-01795	<i>S. epidermidis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			4	resistant	nd	nd
41	12-02138	<i>S. epidermidis</i>	Schleswig-Holstein			0,25	sensitive	nd	nd
69	12-02762	<i>S. epidermidis</i>	Hamburg			4	resistant	+	nd
74	12-02812-	<i>S. epidermidis</i>	Berlin-Brandenburg			0,25	sensitive	nd	nd
116	12-03269-	<i>S. epidermidis</i>	Berlin-Brandenburg			4	resistant	nd	nd
129	12-03349	<i>S. epidermidis</i>	Baden-Württemberg			4	resistant	nd	nd
145	12-03628	<i>S. epidermidis</i>	Berlin-Brandenburg			4	resistant	+	nd
150	12-03718	<i>S. epidermidis</i>	Sachsen-Anhalt			4	resistant	+	nd
153	12-03842-	<i>S. epidermidis</i>	Bayern			2	resistant	+	nd
158	12-03930	<i>S. epidermidis</i>	Sachsen-Anhalt			0,25	sensitive	nd	nd
160	12-03953	<i>S. epidermidis</i>	Niedersachsen			1	resistant	nd	nd
163	12-04493	<i>S. epidermidis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			0,25	sensitive	nd	nd
168	12-04513	<i>S. epidermidis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			0,25	sensitive	nd	nd
3	12-00331	<i>S. haemolyticus</i>	Nordrhein-Westfalen			4	resistant	+	nd
5	12-00376	<i>S. haemolyticus</i>	Baden-Württemberg			4	resistant	nd	nd
7	12-00390	<i>S. haemolyticus</i>	Mecklenburg-Vorpommern			4	resistant	nd	nd
9	12-00644-	<i>S. haemolyticus</i>	Bayern			4	resistant	nd	nd
22	12-01171	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
25	12-01261-	<i>S. haemolyticus</i>	Hessen			4	resistant	nd	nd
63	12-02612	<i>S. haemolyticus</i>	Baden-Württemberg			4	resistant	nd	nd
64	12-02616	<i>S. haemolyticus</i>	Berlin-Brandenburg			4	resistant	+	nd
96	12-02951	<i>S. haemolyticus</i>	Niederlande			4	resistant	nd	nd
131	12-03457	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
132	12-03460	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
134	12-03467-	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
146	12-03640-	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	+	nd
149	12-03700-	<i>S. haemolyticus</i>	Berlin-Brandenburg			4	resistant	nd	nd
166	12-04504	<i>S. haemolyticus</i>	Mecklenburg-Vorpommern			4	resistant	nd	nd
167	12-04506	<i>S. haemolyticus</i>	Mecklenburg-Vorpommern			4	resistant	nd	nd
169	12-04678-	<i>S. haemolyticus</i>	Bayern			4	resistant	nd	nd
170	12-04890	<i>S. haemolyticus</i>	Bayern			4	resistant	nd	nd
176	13-00151	<i>S. haemolyticus</i>	Niedersachsen			4	resistant	nd	nd
177	13-00214-	<i>S. haemolyticus</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
184	13-00694	<i>S. haemolyticus</i>	Sachsen-Anhalt			0,5	resistant	nd	nd
14	12-00813	<i>S. hominis</i>	Nordrhein-Westfalen			2	resistant	nd	nd
38	12-02047	<i>S. hominis</i>	Sachsen			4	resistant	nd	nd
39	12-02111-	<i>S. hominis</i>	Hamburg			0,5	resistant	+	nd
50	12-02364	<i>S. hominis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			4	resistant	nd	nd
152	12-03820	<i>S. hominis</i>	Sachsen-Anhalt			4	resistant	+	nd
154	12-03842-	<i>S. hominis</i>	Bayern			2	resistant	+	nd
164	12-04496	<i>S. hominis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			0,25	sensitive	nd	nd
183	13-00645	<i>S. hominis</i>	Bayern			4	resistant	+	nd

192	13-02058	<i>S. hominis</i>	Nordrhein-Westfalen			0,25	sensitive	nd	nd
197	13-03283	<i>S. hominis</i>	Nordrhein-Westfalen			4	resistant	nd	nd
46	12-02275	<i>S. lugdunensis</i>	Bayern			4	resistant	nd	nd
73	12-02810-	<i>S. lugdunensis</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	+	nd
159	12-03939-	<i>S. lugdunensis</i>	Schleswig-Holstein			0,5	resistant	nd	nd
165	12-04502	<i>S. lugdunensis</i>	Mecklenburg-Vorpommern			0,5	resistant	nd	nd
195	13-02491-	<i>S. lugdunensis</i>	Sachsen			1	resistant	nd	nd
1	12-00055	<i>S. sciuri</i>	Baden-Württemberg			1	resistant	nd	nd
35	12-01969	<i>S. sciuri</i>	Niedersachsen			4	resistant	nd	nd
55	12-02407	<i>S. sciuri</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
151	12-03738	<i>S. sciuri</i>	Niedersachsen			4	resistant	nd	nd
191	13-02056	<i>S. sciuri</i>	Nordrhein-Westfalen			4	resistant	nd	nd
198	13-03352	<i>S. sciuri</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
203	12-03738	<i>S. sciuri</i>	Niedersachsen			>4	resistant	+	nd
204	14-03470	<i>S. sciuri</i>	Hamburg			2	resistant	-	-
42	12-02218	<i>S. warneri</i>	Sachsen-Anhalt			0,25	sensitive	nd	nd
68	12-02757	<i>S. warneri</i>	Sachsen-Anhalt			4	resistant	nd	nd
189	13-02053	<i>S. warneri</i>	Nordrhein-Westfalen			0,25	sensitive	nd	nd
196	13-02733-	<i>S. warneri</i>	Sachsen			4	resistant	nd	nd
199	13-03930-	<i>S. warneri</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	nd	nd
179	13-00237	<i>S. capitis</i>	Sachsen			0,25	sensitive	nd	nd
182	13-00641	<i>S. capitis</i>	Nordrhein-Westfalen			0,25	sensitive	nd	nd
188	13-01164	<i>S. capitis</i>	Sachsen-Anhalt			0,25	sensitive	nd	nd
191	13-02056	<i>S. sciuri</i>	Nordrhein-Westfalen			4	resistant	nd	nd
194	13-02339	<i>S. capitis</i>	Baden-Württemberg			0,25	sensitive	nd	nd
10	12-00675	<i>S. saprophyticus</i>	Bayern			1	resistant	nd	nd
180	13-00414-	<i>S. saprophyticus</i>	Schleswig-Holstein			0,5	resistant	nd	nd
205	15-00778	<i>S. saprophyticus</i>	Baden-Württemberg			2	resistant	-	nd
206	12-00248	<i>S. saprophyticus</i>	Bayern			1	resistant	-	nd
104	12-03098	<i>S.pseudintermediu</i>	Hessen			0,25	sensitive	nd	nd
111	12-03185	<i>S.pseudintermediu</i>	Niedersachsen			2	resistant	+	nd
112	12-03205	<i>S.pseudintermediu</i>	Sachsen			4	resistant	+	nd
178	13-00234	<i>S. cohnii</i>	Sachsen -Anhalt			1	resistant	nd	nd
201	14-03162	<i>S.cohnii</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	+	nd
202	14-03164	<i>S.cohnii</i>	Schleswig-Holstein			4	resistant	+	nd
185	13-00846	<i>S. auricularis</i>	Sachsen			0,25	sensitive	nd	nd
187	13-01159-	<i>S. auricularis</i>	Sachsen-Anhalt			0,25	sensitive	nd	nd
200	13-04316-	<i>S. equorum</i>	Schleswig-Holstein			0,5	resistant	nd	nd
31	12-01608	<i>S. simulans</i>	Niedersachsen			2	resistant	nd	nd
181	13-00415	<i>S. xylosus</i>	Schleswig-Holstein			0,5	resistant	nd	nd

2.1.2. Chemikalien

In den folgenden Tabellen sind die Verbrauchwirkstoffe dieser Arbeit aufgelistet.

Tabelle 2: Die Chemikalien. Mit Angabe von Hersteller und Kompositionen der verwendeten Materialien.

Namen der Chemikalien	Hersteller	Komposition
Primer (Oligonukleotide-Sequenzen)	Metabion (Matrinstried,Dtl.)	siehe Tabelle 3
Sonden(Oligonukleotide-Sequenzen)	Metabion (Matrinstried,Dtl.)	siehe Tabelle 6
PeqGold-Agarose	PeqLab (Erlangen, Dtl.)	1%-iges

peqGREEN-Farbstoff	PeqLab (Erlangen, Dtl.)	Ethidiumbromid-
TAE-Puffer	Bio-Rad (München, Dtl.)	50x Konz.
GeneRuler 1kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific (Darmstadt,	-
6x DNA LoadingDye	Thermo Scientific	1 Ml
DY-647P1-aadUTP	Dyomics (Jane, Dtl.)	1 mM
Spotting-Puffer	Schott (Jena, Dtl.)	Nexterion Spot I
Blocking-Lösung	-	0,1 M Tris (pH 9)
Rinse 1	-	0,1 M Triton X-100
Rinse 2	-	6 Mm HCl
Rinse 3	-	0,1 Mm KCl
10x Dnase-Puffer	PROMEGA (Mannheim, Dtl.)	0,4 M Tris-HCl (pH 8)
DNase-Stoppuffer	-	0,02 M EGTA (pH 8)
RQ RNase-FreeDNase	PROMEGA (Madison, USA)	
20x SSC	VWR International (Dresden, Dtl.)	3 M NaCl
Wasch-Puffer 1	-	2x SSC
Wasch-Puffer 2	-	2x SSC
Wasch-Puffer 3	-	0,2x SSC

2.1.3. Oligonukleotidprimer

In der folgenden Tabelle sind drei Primerpaare aufgelistet, die für die drei gezielten Genabschnitte (23S-rDNA, 16S-rDNA, *mecA*) konzipiert wurden. Diese Primerpaare bestehen aus kurzen Nukleotidsequenzen, die etwa von 15 bis 30 Nukleotiden umfasst werden.

Tabelle 3: Die Primer-Sequenzen. Erläuterungen von der verwendeten drei Primerpaaren mit der Angabe die Größe der Sequenzen.

Primer	Sequenz 5`-3`	Größe des Gens
23S DE 114 f	TCCGAATGGGGAAAC	1840 bp
23S F 1923 r	GAATTTCGCTACCTTAGGA	
hpe 16S 616 f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1485 bp
hpe 16S r	CCTTGTTACGACTTCACCCC	
hpe mecA f4	ATCACTACATCACCAGGTTCAAC	364 bp
hpe mecA r1	CCTGAATCAGCTAATAATATTTTCATT	

2.1.4. Enzyme und Kits

Tabelle 4: Die verwendeten Kits von Qiagen. Das Polymerase-Kit und das Purifikation-Kit.

Hersteller	Kit
Qiagen (Hilden, Dtl.)	HotStarTaq DNA Polymerase
	QIAquick PCR Purification Kit

2.1.5. Geräte

Tabelle 5: Die Laborgeräte. Jedes Gerät wurde mit dem Namen, dem Hersteller, dem Herkunftsort und dem Modell verknüpft.

Hersteller	Ort	Gerät	Modell
Heidolph	Kelheim, Dtl.	Heizplatte mit Magnetrührer	MR Hei Standard
		Thermometermit Temperaturegler	EKT Hei-Con
		Magnetrührer	MR 3001
MJ Research	St. Bruno, Canada	Thermocycler	PTC 200
Eppendorf	Hamburg, Dtl.	Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R
		Eppis und Pipetten	
B. Braun	Melsungen, Dtl.	Inkubator	CeratomaH
PeqLab	Erlangen, Dtl.	Thermoschüttler	Thriller
		Gelkammer	-
		Stromquelle	PeqPower Supply
Analytic Jena	Jena, Dtl.	Geldokumentation	BioDocAnalyse-
Molecular	Sunnyvale, USA	Mikroarray-Laser-Scanner	GenePix 4300A
ArrayIt	California,USA	Array Plate Multi- well Mikroarray	4 Plate System
Scienoin	Berlin, Dtl.	Non-Kontakt-Spotter	sciFLEX
ThermoFisher Scientific	Wilmington, USA	Nanodrop Spectrophotometrie	ND - 1000
PolyAn	Berlin, Dtl.	Objektträger	3D- Epoxy Glass

2.1.6. Bioinformatische Anwendungen

NCBI (PubMed): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Arb Silva Software: <https://www.arb-silva.de/>

Annealing-Temperatur berechnen: <http://tmcalculator.neb.com/>

SILVA (TestProbe): <https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation der genomischen DNA

Um eine Multiplex-PCR durchführen zu können, sollte die gDNA der Stämme zuerst isoliert werden. In diesem Fall waren die Staphylokokken-Stämme vom RKI bereits am Fraunhofer Institut vorhanden und wurden schon durch die Mitarbeiter im S2-Labor isoliert. Die Schritte der Isolation wurden somit anhand eines Standard-Protokolls vom RKI und mit Hilfe der Angabe des eingesetzten Isolations-Kits erfolgt. im Schluss daran wurden die Konzentrationen aller isolierten DNA mittels einer Spektrophotometrie (Nanodrop) Station bestimmt. Abschließend wurde die gDNA bei – 20 °C im Gefrierschrank eingelagert.

2.2.2. Optimierung einer Multiplex-PCR

Als Zielschritt dieser Arbeit steht die Optimierung einer Multiplex-PCR im Vordergrund, damit alle drei gezielten Gene gleichzeitig und in ausreichenden Konzentrationen amplifiziert werden. Die getesteten Genfragmente in diesem Experiment haben unterschiedliche Sequenzgrößen, wobei das 23S-rDNA Genfragment mit 1840 bp das größte gezielte Genfragment ist. Daneben steht das 16S-rDNA-Gen mit 1485 bp und das *mecA*-Gen mit 364 bp als relevanten Genen für die Identifikation von MRSA und der Nachweis von der Resistenz zu Verfügung. Aufgrund dieser Strukturvariation der verwendeten Genprodukte, könnte die Optimierung eine Multiplex-PCR sehr schwierig sein. Da alle PCR-Komponenten optimal zusammengesetzt werden sollen und für die erwünschten drei Genfragmente in reichlicher Quantität zur Verfügung stellen. Aus diesem Grund wurden die Komponenten im Ablauf dieser Arbeit wie möglich angepasst, um die beste Ausbeute von den Genen synchron zu liefern. Bei den Primerpaaren handelt es sich um Oligonukleotidensequenzen mit nur 18 – 30 Nukleotiden, die an der 3' Ende des Vorlagestrangs anlagert werden und in der Richtung 5'- 3' beginnen die neue DNA aufzubauen. Die Primerpaare sollen daher für die Amplifikation jeweils DNA-Molekül ausreichend sein. Außerdem wurden aufgrund der Strukturvariation der getesteten Gene, besonders das 23S-rDNA Gen, unterschiedliche Primerpaare Konzentration von 0,3 bis 0,8 Mm getestet. Das 23S-rDNA ist das größte getestete Gen (mit 1840 bp), hatte immer eine verminderte Ausbeute im Vergleich zur anderen Genen. Von daher wurde hier immer eine relativ hohe Primer-Konzentration für es eingesetzt. Der Hersteller vom verwendeten Kit gab eine Menge im Bereich von 0,1 bis 0,5 Mm an. Hierunter wurde genauso die *Taq*-Polymerase in unterschiedlichen Endkonzentrationen von 0,2 bis 0,5 U/µl HotStar*Taq*-Polymerase pro Ansatz geprüft, um zu finden, welche die bessere geeignete Konzentration für die Reaktion ist. Der Hersteller (Qiagen) hat eine Ausgangskonzentration von 2.5 U *Taq*-Polymerase für Standard-PCR empfohlen (25), dennoch wurde hier eine Ausgangskonzentration von 5 U/ µl für Multiplex PCR bei allen Experimenten verwendet. Des Weiteren stellt sich die Konzentration von Deoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs) als eine wichtige Komponente der PCR dar, deshalb wurden hier, um die bessere dNTPs Konzentration herauszufinden, mehrere Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 Mm untersucht. Außerdem hat der Hersteller (Qiagen) eine Konzentration von 0.2 Mm dNTPs pro PCR-Ansatz angeraten. Darüber hinaus spielt die dNTPs hinsichtlich auf ihre Teilnahme am Aufbau der neueren DNA-Strängen eine wichtige Rolle. Das heißt, dass sie bis zum Ende einer PCR-Reaktion verfügbar sein sollte. Eine weitere wichtige PCR-Komponenten sind die MgCl₂ Ionen, deren Anwesenheit in

ausreichender Menge für die PCR-Reaktion unvermeidbar ist. Die *Taq*-Polymerase benötigt die $MgCl_2$ Ionen, da sie als Kofaktor für die Enzymaktivität dienen. Darüber hinaus fördern die $MgCl_2$ Ionen die Konstruktion von den dNTPs in den neueren DNA-Strängen, was durch die Bildung von einem löslichen Komplex mit den dNTPs-Molekülen in der Reaktion erreicht wird. Beim verwendeten *Taq*-Polymerase Kit von Qiagen ist eine Menge von 1,5 Mm $MgCl_2$ bereits in Kit-Puffer vorhanden, wurde aber hier außerdem noch 1 und 2 Mm $MgCl_2$ im Rahmen der Besserung von der Ausbeute dazugegeben. Außerdem ist hier wichtig zu erwähnen, dass der geringe *Taq*-Pufferkonzentration die Amplifikation von den langen Genfragmenten (hier: 23S-rDNA) viel verbessert und im Gegensatz dazu, werden die kurzen Genfragmente mit einer erhöhten *Taq*-Pufferkonzentration besser amplifiziert (26). Des Weiteren beinhaltet das verwendete *Taq*-Polymerase Kit von Qiagen der sogenannten Q-Solution, welche nach der Angabe des Kits zur Verstärkung der schwierigen Amplifikationen mittels der Modifikation der Schmelzverhalten von DNA-Molekülen führen kann und die suboptimal PCR-Systeme, die durch die DNA-Molekülen mit hohem Sekundärstrukturaufbau verursacht werden oder die GC-reich sind, positiv beeinflussen kann (27). Die Elongationszeit und die Anlagerungstemperatur sind sehr wichtige Parameter für den angestrebten Erfolg einer PCR. In der Regel rechnet man pro 1000 bp 1 min Elongationszeit, deshalb wurde hier eine Elongationszeit von 2 min herangezogen, um das größte Genfragment (23S-rDNA mit 1840 bp) die genug Zeit für optimale Amplifikation zu geben. Die Anlagerungstemperaturen der Primerpaare wurden hier durch ein webbasiertes Analyse Tool am Fraunhofer Institut berechnet, wobei eine Temperatur von 45 °C für *mecA*- und 23S-rDNA-Gen und eine von 50 °C für 16S-rDNA bestimmt werden. Der Erfolg einer Multiplex-PCR setzt zuerst eine geeignete Anlagerungstemperatur für die verwendete Primer voraus, um die Untersuchung von mehreren Genen gleichzeitig zu ermöglichen. Der Hersteller hat eine primäre optimale Anlagerungstemperatur empfohlen, welcher 5 °C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer sein sollte. Hier wurde sowohl eine Anlagerungstemperatur von 50 °C als auch eine Anlagerungszeit von 30 s eingesetzt. Neben der Anlagerungstemperatur und Anlagerungszeit wurde die Elongationstemperatur auch eingestellt, wobei wurde hier eine Temperatur von 68 °C statt 72 °C eingesetzt, um die Amplifikation von dem größten Gen (23S-rDNA) zu erzielen. Da es festgestellt wurde, dass die Verwendung von hoher Elongationstemperatur die Amplifikation der langen Genfragmente reduzieren kann (26). Der Zyklus eines PCR-Programms besteht in der Regel aus 25-35 Zyklen, abhängig von der Kopien-Anzahl der Ausgangsvorlage. Die Erhöhung der Zyklenzahl führt nicht unbedingt zu einer höheren Ausbeute an PCR-Produkten, stattdessen können sie die Ausbeute an

spezifischen PCR-Produkten verringern. Hier wurde eine Zyklenzahl für eine Multiplex-PCR von 40 genutzt. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt und danach die DNA zu jedem Ansatz hinzugegeben. Abschließend wurden alle Komponenten zusammengemischt. Das Gesamtvolumen eines einzelnen Ansatzes betrug 12,5 µl, was sowohl zur starken Verringerung der Arbeitskosten als auch zur positiven Beeinflussung der Ausbeute führte.

2.2.3. Einsatz von Markierungs-PCR für DNA-Amplifikation

Nachdem die Amplifikation von den gezielten Genfragmenten mittels einer optimierten Screening-PCR gelungen war, wurde die Durchführung von der Markierungs-PCR erfolgt. Im Gegensatz zu einer Markierungs-PCR weist eine Screening-PCR keinen Fluoreszenzfarbstoff gelabeltend NTPs auf. Eine Screening-PCR ermöglicht es zunächst zu überprüfen, ob alle erwünschten Genfragmente gleichzeitig effektiv amplifiziert werden können oder nicht. Als ein Screening-PCR Protokoll erfolgreich optimiert und etabliert wurde, wurde die Markierungs-PCR durchgeführt. Bei einer Markierungs-PCR handelt es sich dabei um einen PCR-Ansatz wie der Screening-PCR Ansatz mit zusätzlichem Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffs. Der verwendete Farbstoff ist hier Dy647P1 von der Firma Dyomics (Jena, Dtl.), welcher an der dUTP (Desoxyuridintriphosphat) bindet. Der Farbstoff Dy647P1 ist auf Pentamethin basierender Fluorophor und hat eine angemessene wasserlösliche Eigenschaft. Weiterhin entspricht er in seinen Spektraleigenschaften nahezu denen von Cy5-Farbstoff und ist von daher für die Mikroarray-Experimente gut geeignet. Dy647P1 wird das Licht bei einer maximalen Wellenlänge von 653 nm absorbiert und bei 672 nm emittiert. Obwohl der Farbstoff Dy647P1 an Deoxyuridintriphosphat (dUTP) gebunden wird, zeigt er eine gute Photostabilität und Fluoreszenz, die in der Regel höher sind als diese von Farbstoff Cy5. Farbstoff-Cy5 wird an Deoxycytidintriphosphat (dCTP) gebunden und das Licht bei einer Wellenlänge von 647 nm absorbiert und bei 673 nm emittiert. Cy5 wurde aufgrund seiner hervorragenden spektralen Eigenschaften häufig in Microarray-Experimente genutzt. Da Cy5 sehr teuer ist wurde nach einem kostengünstigeren alternativen Farbstoff gesucht, der ähnlich stabil wie Cy5 wirkt. Das war hier Dy647P1 von Firma Dyomics.

Weiterhin war es sehr wichtig ein bestimmtes Verhältnis von den gelabelten Nukleotiden (dUTP) und den ungelabelten Nukleotiden (dTTP) in der PCR zu finden, da es beim Einbau von Fluoreszenzfarbstoff in allen möglichen Positionen zu einer sterischen Hinderung kommen kann. Deswegen wurden 3 Teile ungelabelten dTTP mit 2 Teilen gelabelten dUTP gemischt, um die Entstehung von diesem Phänomen zu umgehen. In dieser Arbeit hat oft das größte 23S-rDNA Genabschnitt wie erwähnt das verminderte Ergebnis im Vergleich zur 16S-

rDNA und *mecA* Genen gezeigt, besonders bei den *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* Stämmen sowie noch andere getesteten Stämme. Mit dem optimierten Screening-PCR Ansatz in Zuge dieser Arbeit können die drei Genfragmente gleichzeitig erfolgreich für alle Stämme amplifiziert werden. In der erfolgten Fluoreszenzmarkierungs-PCR war die Amplifikation vom 23S-rDNA Gen bei den mehreren Stämmen entweder sehr gering oder gar nicht aufgetreten. Aus diesem Grund war es hier nötig einen zusätzlichen Monoplex-Markierungs-PCR Ansatz mit 23S-rDNA für diese Stämme anzuschließen.

2.2.4. Gelelektrophorese

Um den Erfolg eines PCR-Ansatzes nachzuweisen, erfolgte unmittelbar die Durchführung von einer Gelelektrophorese. Bei einer Gelelektrophorese wurden 2 µl des Screening-Ansatzes mit 1 µl 6 x Ladepuffer und 3 µl Wasser gemischt und ebenfalls 0,5 µl des Markierungs-Ansatzes mit 1 µl 6 x Ladepuffer und 4,5 µl Wasser verdünnt. Als nächstes wurde das 1%-iges Agarose-Gel vorbereitet, hierfür wurde die Agarose in 1 x TEA-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellen herd gelöst. Danach wurde die Gellösung auf etwa 60 °C mit Wasser bei Raumtemperatur abgekühlt, anschließend wurden 5 µl peqGreen-Farbstoff von PeqLab pro 100 ml Agarose-Gel dazugegeben und gut gemischt. Dieser peqGreen-Farbstoff geht es um einen Ethidiumbromid-alternativen Farbstoff. Abschließend wurde die Agaroselösung schnell in eine Gelkammer gegossen und ca. 10 – 15 min stehen gelassen, bis die Agaroselösung fest wurde. Nachdem die vorherigen vorbereiteten PCR-Produkte mit Ladepuffer in den Taschen aufgetragen wurden, erfolgte die Auftrennung für 30 min bei 120 mV im 1 x TEA-Puffer. Zum Schluss erfolgte die Dokumentation des Gels mit Hilfe des BioDocAnalyse (BDA)-System.

2.2.5. DNA-Aufreinigung

Als der Nachweis von Amplifikation der Gene durch die Gelelektrophorese gewährleistet wurde, mussten die gelabelten PCR-Proben vor der angestrebten Hybridisierung auf einem Microarray aufgereinigt werden. Die PCR-Proben beinhalten hier die Multiplex-PCR und die Monoplex-PCR für die Stämme, bei denen das 23S-rDNA Gen in einem Multiplex-PCR Ansatz nicht ausreichend oder gar nicht amplifiziert wurde. Die Aufreinigung erfolgt mittels eines QIAquick PCR Purifikation Kit von Qiagen und wurde nach der Angabe des Kit-Protokolls durchgeführt. Der Zweck der Aufreinigung ist die Entfernung von nicht gelabelten Nukleotiden, Primer und *Taq*-Polymerase sowie die anderen wertlos PCR-Komponenten. Zuerst wurde ein Volumen Multiplex-PCR Ansatz 12 µl mit dem 5-fachen Volumen

Bindepuffer (PB) 60 µl versetzt, wobei das Gesamtvolumen 72 µl betrug. Bei Vorliegen von zwei Ansätzen für einen Stamm d.h. eine Multiplex- bzw. eine Monoplex-PCR wurden beide Ansätze separat mit dem Bindepuffer (PB) verdünnt und dann nacheinander auf eine Säule aufgetragen. Danach wurden die Proben für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurden sie durch die Zugabe von 750 µl PE-Puffer gewaschen, ebenso erfolgte der Waschschriff mit einer Minute Zentrifugalzeit. Abschließend wurden die Proben mit 30 µl Reinst-Wasser eluiert und für 1 min in Raumtemperatur inkubiert, dann wiederum für 1 min zentrifugiert. Die Konzentration der DNA und die Konzentration des Farbstoffs einer Probe wurden folgendermaßen durch eine Spektrophotometrie (Nanodrop) bestimmt, hierbei erfolgten drei Messung pro Probe, von denen anschließend ein Mittelwert in einer etablierten MS Excel-Applikation im Fraunhofer Institut gerechnet wurde.

2.2.6. Ermittlung der Dy647P1- Einbaurate und Verdau der DNA

Die Einbaurate R gibt den durchschnittlichen Abstand der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotiden innerhalb des amplifizierten DNA-Fragments an. Bei der Einbaurate handelt es sich um die Anzahl von Nukleotiden und besitzt daher keine Einheit. Als die Bestimmung von den Farbstoff-Konzentrationen mittels Nanodrop durchgeführt wurde, konnte man die Einbaurate des Farbstoffs aus den eventuellen Informationen durch die folgende Formel berechnen:

$$R = \frac{\text{DNA - Konzentration} \left[\frac{\text{molNt}}{\text{molDy647P1}} \right] * 1000}{\left(\text{Farbstoff - Konzentration} \left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \right] * \text{durchschnittlicheNt} - \text{Masse} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \right)}$$

Die DNA-Konzentration ist in ng /µl und die Farbstoff-Konzentration ist in pmol / µl angegeben. Außerdem ist Nt die molare Masse eines Nukleotids und sie betrug 330 g/mol. Nach dieser Angabe ist es ersichtlich, dass bei einer hohen Einbaurate weniger Fluoreszenz-markierten Nukleotiden im amplifizierten DNA-Fragment sind, als bei einer geringeren Einbaurate. Um die Hybridisierung der Ziel-DNA mit eignen komplementären Sonden zu erhöhen, wurden die PCP-Produkte vorab unspezifisch in den kleinen DNA-Fragmenten verdaut. Dieser Verdau könnte die Verdrängung umgehen, welche durch die kräftige Bindung der neueren amplifizierten DNA-Doppelstränge miteinander auftritt und kann zur Beeinträchtigung der angestrebten optimale Bindung zwischen der Ziel-DNA und deren komplementären Sonde führen. Die DNA-Konzentration wurde mittels einer Spektrophotometrie (Nanodrop) ermittelt, davon wurden die verdauende DNA-Menge und DNase-Menge festgelegt. Bei diesem Versuch wurde eine DNA-Menge von 600 ng pro

Ansatz eingesetzt, wobei pro 100 ng DNA 0,8 µl 1:10 verdünnte DNase verwendet wurde. Des Weiteren wurden 4 µl 1-fach verdünnte DNase-Puffer dazugegeben, um die besseren Bedingungen für die Auswirkung der DNase zu erreichen. Neben der DNA-Volumen, der DNase-Enzym und dem DNase-Puffer wurde Abschließend das Restvolumen mit Reinst-Wasser aufgefüllt, bis einem Gesamtvolumen von 40 µl pro Probe zu treffen. Der Verdau-Schritt wurde exakt für 5 min (+/- 2 s) gedauert, anschließend wurde die Unterbrechung der Verdauung durch die Zugabe von 6 µl Stopp-Puffer (20 mM EGTA-Stopplösung) mit einer Endkonzentration von 2,6 mM erfolgt. Unverzüglich wurde die Verdau-Lösung mit einem Gesamtvolumen von 46 µL für 10 min bei 65 ° C im Schüttler inkubiert, um die DNase zu denaturieren. Abschließend musste der Hybridisierungsansatz am gleichen Tag durchgeführt werden.

2.2.7. DNA-Microarray

2.2.7.1. Vorbereitung der Sonden und Kontrollen

Auf dem hier verwendeten Microarray wurden die Sonden am Fraunhofer Institut mittels eines Nicht-Kontakt-verfahrenen aufgebracht. Die Sonden wurden für die Identifikation von spezifischen Stämmen entwickelt und sie wurden am Fraunhofer Institut mit Hilfe der Software Arb Silva entwickelt (20). Bei der Sonde handelt es sich um Oligonukleotidsequenz. In der folgenden Tabelle 6 sind alle verwendeten Sonden dieser Arbeit aufgelistet. Außerdem wurden ihre Sequenz, Stammspezifität, Gene und die Anlagerungstemperaturen dazu angegeben. Die angegebene Spezifität basiert auf *in silico* Daten. Die Sonden-Sequenzen befinden sich entweder im 16S- oder 23S-Gen, welche für die entsprechenden Untereinheiten der Ribosomen, also 16S- bzw. 23S-rDNA kodieren und somit in jedem Bakterium auftreten. Diese 16S- und 23S-rDNA Gene werden genutzt, um Großgruppen von Bakterien zu systematisieren. Sie eignen sich daher zur Spezies identifikation, da sie aufgrund ihres geringeren Evolutionspotentials als stabile Referenzgröße dienen.

Die Größe wird meist durch einen S-Wert (die Sedimentationskonstante) angegeben. Außerdem sind noch zwei Sonden auf jedem Microarray bedruckt, welche spezifisch für das *mecA*-Gen sind und für die Detektion von der Antibiotika-Resistenz verwendet werden. Hierbei konnte an diesen zwei Sonden eine Diskriminierung im Hinweis auf dem SCCmec-Typ ausgemacht werden, ob es sich um SCCmec-Typ I bis X oder ein SCCmec-Typ XI handelt. Das Gen mit dem SCCmec-Typ XI ist auch als *mecC*-Gen bekannt. Dazu wurden gleichfalls in der Tabelle 6 dargestellt, ob es um SNP-Sonden, Nicht-SNP-Sonden, Resistenzsonden und Kontrollsonden geht. Bei den meisten Sonden handelt es sich um SNP-

Sonden, bei denen sich die einzelne Sonde eines Sondensatzes (aus vier Sonden) nur in einer Base von übrigen Sonden unterscheidet. Die Base, durch die sich die Sonden-Sequenz eines Sondensatz unterscheidet, ist in der Tabelle 6 Rot markiert worden.

Tabelle 6: Die Sonden. Mit Auskünften bezüglich der Sequenzen, Spezifität, eignen Gen und die Anlagerungstemperaturen.

Sonde	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Gen	T _m in °C	
Sau227i	ATGGATCCGCGCTGCATT	<i>S. aureus</i>	16S	58	Nicht-SNP-Sonden
Sau69i	CGGACGAGAAGCTTGCTTC	<i>S. aureus</i>	16S	56,2	
Sha193	AAACCATCTTTCACATCG	<i>S. haemolyticus</i>	16S	47,1	
Sep1498	TCAGCCTTATGAGTGCCG	<i>S. epidermidis</i>	23S	54,7	
Sha158i	GAATTCATAGCTTGTGAGA	<i>S. haemolyticus</i>	23S	46,8	SNP-Sonden
Sspp1414i	CGTTTTAATCGATGGGGG	<i>S. aureus</i>	23S	50,8	
		<i>S. epidermidis</i>			
		<i>S. haemolyticus</i>			
Sep1472 C	CTAA C ACTCAGCCTTACT	<i>S. epidermidis</i>	23S	48,1	
Sep1472 T	CTAA T ACTCAGCCTTACT	<i>S. aureus</i>		44,7	
Sep1472 G	CTAA G ACTCAGCCTTACT	-		47,5	
Sep1472 A	CTAA A ACTCAGCCTTACT	-		45,8	
Sau230i T	GATCCGCG C TGCATTAGC	<i>S. aureus</i>	16S	57,1	
Sau230i C	GATCCGCG C CGCATTAGC	<i>S. epidermidis</i>		59,9	
Sau230i G	GATCCGCG C GCGCATTAGC	-		59,9	
Sau230i A	GATCCGCG C AGCATTAGC	-		57,1	
Sau231i T	ATCCGCG C TGCATTA	<i>S. aureus</i>	16S	51,3	
Sau231i C	ATCCGCG C CGCATT	<i>S. epidermidis</i>		54,9	
Sau231i G	ATCCGCG C GCGCATT	-		54,9	
Sau231i A	ATCCGCG C AGCATT	-		51,3	
Sau191i A	GTTCAA A AGTGAAAGACGGT	<i>S. aureus</i>	16S	51	
Sau191i T	GTTCAA T AGTGAAAGACGGT	<i>S. epidermidis</i>		50	
Sau191i C	GTTCAA C AGTGAAAGACGGT	<i>S. epidermidis</i>		53	
Sau191i G	GTTCAA G AGTGAAAGACGGT	-		52,5	
Sepi195i T	AAGACGGT T TGCTGTCA	<i>S. epidermidis</i>	16S	52,1	
Sepi195i C	AAGACGGT C TTGCTGTCA	<i>S. aureus</i>		53,8	
Sepi195i G	AAGACGGT G TTGCTGTCA	-		-	
Sepi195i A	AAGACGGT A TTGCTGTCA	-		-	
Shaem66i A	CGAACAGAC A AGGAGCTT	<i>S. haemolyticus</i>	16S	52,2	
Shaem66i G	CGAACAGAC G AGGAGCTT	<i>S. aureus</i>		54,4	
		<i>S. epidermidis</i>			
Shaem66i T	CGAACAGAC T AGGAGCTT	-		51	
Shaem66i C	CGAACAGAC C AGGAGCTT	-	54,5		

Sau69i GAT	CGGACGAGAAGCTTGCTT	<i>S. aureus</i>		55,4	
Sau69i AGC	CAGACGAGGAGCTTGCTC	<i>S. epidermidis</i>	16S	55,5	
mecA I-X	AGAGTAGCACTCGAATTAGGCA	-	mecA (I-X)	55,5	Resistenz -Sonden
mecA XI	CCGCATTGCATTAGCATTAGGA	-	mecA (XI)	55,8	
HPE343	TTTTTTTTTTTTTCTGCTGCCTCCCGTA	allg. Bakterien	16S	54,2	Kontroll- Sonden
HPE907	TTTTTTTTTTTTTGTCAATTCCTTTGAGTTT	allg. Bakterien		44,8	
EUB338	TTTTTTTTTTTTTGTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubakterien		59,4	
NHK	TTTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA	NHK	<i>A. thaliana</i>	47,1	
PHK	TTTTTTTTTTTTTGATTGGACGAGTCAGGAGC	PHK	<i>A. thaliana</i>	55,2	
Spot	TTTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA- Cy5	Eckpunktmarker	<i>A. thaliana</i>	47,1	
HybCon	Cy5-GCTCCTGACTCGTCCAATC	PHK- Komplement	-	55,2	

Die Sonden weisen an ihrem 5'-Ende einen Poly-Thymin-Schwanz auf, welcher aus etwa 13 Thyminbasen stammt. Dieser ist auch als Spacer benannt. Der Spacer wurde eingesetzt, um die optimale Hybridisierungsergebnis von der Ziel-DNA und die komplementäre Sonde auf dem Array zu erhalten. Der Spacer bindet an der Objektträgeroberfläche und dient als Abstandshalter zwischen der Sonde und der Oberfläche. Eine weitere Anmerkung ist der Name von der Sonde, welcher die Bindungsposition der Sonde im Gen entspricht und als Zahlenwert bezeichnet wurde. Neben den Identifikationssonden und den Resistenzsonden wurden zusätzlich die Kontrollsonden auf dem DNA-Microarray untergebracht, wobei es sich bei den Kontrollsonden HPE343, HPE907 und EUB338 um Prozesskontrollen handelt. Die Kontrollsonden sind komplementär zu hoch konservierten Bereichen der 16S rDNA der allgemeinen Bakterien, deswegen sollten sie immer ein positives Signal anbieten. Sie unterscheiden sich stark von der Ziel-DNA der Staphylokokken, um die Chance der Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Alle Sequenzen der Kontrollsonden sind in der Tabelle 6 mit ihrem Poly-Thymin-Schwanz dargestellt, da dieser bei den Kontrollsonden nicht immer exakt aus 13 Thyminbasen besteht. Außerdem sind die Sonden der sogenannten der NHK (negativen Hybridisierungskontrolle) auf jedem Microarray immobilisiert, welche aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* stammen. Die NHK dürfen unter keinen Umständen ein Signal zeigen. Zusätzlich wurde ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (HybCon) zu dem Hybridisierungsansatz hinzugegeben, welches komplementär zur Sequenz der PHK (positiven Hybridisierungskontrolle) ist. Die Hybridisierungskontrolle (HybCon) ist an Cy5-Farbstoff gebunden und besitzt damit keine Sonde. Diese lässt sich ein richtig negatives Ergebnis von

einer fehlgeschlagenen Hybridisierung unterscheiden. Die PHK sollte demnach immer ein positives Signal geben und ihre Sequenz stammt aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wie die Sequenzen der NHK, der HybCon und des Eckpunktmarkers. Die Sequenzen der sogenannten Eckpunktmarker wurden ebenso auf jedem einzelnen Microarray gespottet, diese wurden grundsätzlich aus der Sequenz der Negativen Hybridisierungskontrolle vorbereitet und ist bereits Cy5-Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Mit Hilfe dieser Eckpunktmarker lässt sich die Positionsangabe eines Subarrays definieren.

2.2.7.2. Spotten

Das Spotten eines Arrays mit den Sonden wurde mittels eines Nicht-Kontakt-Verfahrens am Fraunhofer IZI-BB erfolgt. Das Spotten wurde mit Hilfe eines zuständigen Mitarbeiters im Institut durchgeführt. Hierfür wurden zuerst im Labor die Sonden-Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 100 µl vorbereitet, wobei 20 µl der jeweiligen Sonden-Lösung, 50 µl 2 x Nexterion-Spotting-Puffer und 30 µl Reinst-Wasser zusammen gemischt wurden. Darüber hinaus wurden die Eckpunktmarker aus 5 µl deren Lösung mit 65 µl Reinst-Wasser hergestellt. Die Abbildung 6 zeigt das verwendete Microarray-Layout und bzw. die Anordnung von den konzipierten Sonden, Kontrollen und Puffer auf einem Objektträger, nach dem er gespottet wurde. Ein Microarray hier besteht aus den Speziesidentifikationssonden einschließlich sechs SNP-Sondensätze, acht Nicht-SNP-Sonden und zwei *mecA*-Sonden und auch aus Kontrollsonden, NHK, PHK und Eckpunktmarkern. Die verwendeten Trägermaterialien in dieser Arbeit sind PolyAn Glasslides von der Firma PolyAn (Berlin, Dtl.), diese wurden bereits von dem Hersteller mit Epoxy-Gruppen beschichtet. Hauptsächlich wurden in dieser Arbeit auf einem Slide 12 Subarrays mit 8 x 12 Spots untergebracht, wobei jeder Spot mit einem Abstand von 400 µm von nächstgelegenen Spot entfernt ist. Weiterhin wurde es im Rahmen der Steigerung von der Spezifität empfohlen, die Sonden zweimal auf Microarray zu spotten. In der Abbildung 6 sind alle Sonden, die in rot dargestellt, 23S-rDNA bzw. alle Sonden in schwarz sind 16S-rDNA. Die zwei *mecA*-Sonden wurden in blau angegeben. Weiterhin es schematisch dargestellt wurde, in welche Weise die negative Hybridisierungskontrolle, die positive Hybridisierungskontrolle, die Spots (Eckpunktmarkers) und die Prozesskontrolle-Sonden auf einem Objektträger arrangiert wurden.

Spot	Spot	NHK	PHK	HPE343	HPE907	EUB338	Spot
Sau230i_A	Sau230i_A	Sau231i_A	Sau231i_A	Sep1472_A	Sep1472_A	Sau191i_A	Sau191i_A
Sau230i_G	Sau230i_G	Sau231i_G	Sau231i_G	Sep1472_G	Sep1472_G	Sau191i_G	Sau191i_G
Sau230i_T	Sau230i_T	Sau231i_T	Sau231i_T	Sep1472_T	Sep1472_T	Sau191i_T	Sau191i_T
Sau230i_C	Sau230i_C	Sau231i_C	Sau231i_C	Sep1472_C	Sep1472_C	Sau191i-C	Sau191i-C
Spot	NHK	PHK	NHK	HPE343	HPE907	EUB338	Spot
Sepi195i_A	Sepi195i_A	Shaem66i_A	Shaem66i_A	Sau227i	Sau227i	Sha185i	Sha185i
Sepi195i_G	Sepi195i_G	Shaem66i_G	Shaem66i_G	Sep1498	Sep1499	Sau69i_GAT	Sau69i_GAT
Sepi195i_T	Sepi195i_T	Shaem66i_T	Shaem66i_T	Sspp1414i	Sspp1414i	Sau69i_AGC	Sau69i_AGC
Sepi195i_C	Sepi195i_C	Shaem66i_C	Shaem66i_C	Sha193	Sha193	Sau69i	Sau69i
mecA_I-X	mecA_I-X	mecA_XI	mecA_XI	Puffer	Puffer	Puffer	Puffer
Spot	NHK	PHK	NHK	HPE343	HPE907	EUB338	Spot

Abbildung 6: Microarray-Layout. Der Microarray beinhaltet der SNP-und Nicht SNP-Sonden sowie zwei mecA-Sonden. Alle Sonden in **rot** sind 23S-Sonden, außerdem sind die Sonden in **schwarz** spezifisch für 16S-Sonden und die **blauen** Sonden gehören zu den *mecA*-Sonden. Weiterhin gibt es auch auf dem Array die Kontrollsonden, die NHK, die PHK und die Spots (Eckpunktmarkers).

2.2.7.3. Backen und Blocken

Nachdem Spotten der Slides wurden alle Slides für 30 min bei 60 °C in einem Trockenofen inkubiert, um die aminomodifizierten Sonden an die Epoxy-Gruppen der Slides-Oberfläche kovalent zu binden. Nach diesem Schritt konnten die Slides ohne Wertverlust für einige Monate lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert werden. Die reaktiven Epoxy-Gruppen auf den Objektträgern könnten bei der Hybridisierung auch an der Ziel-DNA binden. Damit die reaktiven und Sonden ungebundenen Epoxy-Gruppen auf dem Glasträger vor der Hybridisierung inaktiviert werden, muss die Glasoberfläche zunächst geblockt werden. Das Blocken wird normalerweise am gleichen Tag der Hybridisierung oder am Vortag durchgeführt. Grundsätzlich besteht die Blocking-Lösung aus Ethanolamin, welches an den Epoxy-Gruppen gebunden wird. Hierbei wurde zunächst die Blocking-Lösung auf 50 °C erwärmt, welches durch eine Heizplatte mit einem Thermometer von Heidolph (Kelheim, Dtl.) durchgeführt wurde. Nachdem die Slides bei 60 °C gebacken wurden, wurden sie erst in einem Färbegrad mit Rinse 1 Lösung auf einem Magnetprüher für 5 min gewaschen. Ebenso schrittweise wurden sie für 4 min in Rinse 2 und dann für 10 min in Rinse 3 inkubiert. Weiterhin ist es wichtig bei der Übertragung der Oberträgerhalterung zwischen die drei Rinse Lösungen zu merken, dass die Slides nicht in der Zwischenzeit trocken werden.

Im Schluss daran wurden die Slides für 1 min lang in Wasser gelassen und dann für 15 min in der vorgewärmten Blocking-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Slides noch einmal für 1 min in Wasser getaucht und dann mit einem Stickstoffgas trocken geblasen.

2.2.8. Hybridisierung und Auswertung

2.2.8.1. Hybridisierung und Waschen

Die Hybridisierung sollte unmittelbar nach dem Verdau durchgeführt werden, weshalb ein Hybridisierungsansatz am selben Tag daneben hergestellt wurde. Der Hybridisierungsmastermix fasst pro Ansatz 0,5 µl Hybridisierungskontrolle (2000-fach verdünnt), 7 µl 20 x SSC (mit Endkonzentration im Ansatz von 2 x SSC) und 26,5 µl Reinst-Wasser um. Als nächstes wurde pro Ansatz eine Menge von 34 µl aus dem Hybridisierungsmastermix entnommen und dann mit der 46 µl der verdauten DNA-Probe gemischt. Das Gesamtvolumen von 80 µl wurde vollständig für eine Hybridisierung verwendet. Zusätzlich wurden auf jedem Objektträger eine Hybridisierungskontrolle und eine Negativkontrolle hybridisiert, hierfür wurde die Hybridisierungskontrolle aus 46 µl Reinst-Wasser und 34 µl Hybridisierungsansatz vorbereitet und die Negativkontrolle aus 46 µl PCR-Negativkontrolle (NTC) und 34 µl Hybridisierungskontrolle hergestellt. Bevor die Lösungen der Hybridisierungsansätze auf einem Microarray pipettiert, sollte zunächst die Hybridisierungsrähmchen auf die Slide fest fixiert werden. Sodass eine Kammer für jeden Ansatz auf dem Microarray vorhanden worden ist. Im Schluss daran wurden die Ansätze sorgfältig schnell und luftblasenfrei in den Kammern hineinpipettiert. Nachdem alle Proben in einer gemerkten Reihenfolge pipettiert wurden, wurden die Hybridisierungsrähmchen mit PCR-Folie geklebt. Durch die PCR-Folie konnte eine konsekutive mögliche Verdunstung von den Lösungen verringert werden. Anschließend wurde die Hybridisierung für 1 h bei 350 rpm mit einer Hybridisierungstemperatur von 48 °C vorkommen. Hierfür sollte die Hybridisierungsstation (ArrayIt, USA) voraussichtlich 15 min vor dem Hybridisierungsablauf eingeschaltet und bis 48 °C vorgewärmt werden. Abschließend wurden die Slides gewaschen, damit alle nicht- oder suboptimal gebundene Ziel-DNA mit Sonden entfernt wurden. Bei der Vorbereitung für den Waschschrift wurden zuerst die drei verwendeten Waschlösungen in eignen Färbebaden gegossen, insbesondere wurde bei Wash 1 zusätzlich eine Lösungsmenge von 250 ml mit 2,5 ml 20 % SDS (Endkonzentration 2 % SDS) versetzt. Die drei Waschschriffe wurden hier bei Raumtemperatur und auf einem Magnetrührer für 10 min abgelaufen. Danach wurden die Slides für 1 s in Reinst-Wasser getaucht, um eine Salzkristallbildung beim folgenden Trocknen mit einem Stickstoff zu vermeiden. Nachdem

die Hybridisierung angefertigt wurde, erfolgte das Scannen mittels eines GenePix-Scanners. Der GenePix-Scanner bietet eine maximale Flexibilität an und seine Konfigurationen fassen bis zu vier Anregungswellenlaser und sechzehn Emissionswellenlängenfilter um.

Anfangs wurde das Einschalten vom Scanner 15 bis 30 min vor der Verwendung erfolgt, um optimales Auslesen der Signale durch Aufwärmung des Lasers zu ermöglichen. Das Verstellen des GenePix-Verwendungsprogramms wurde zu Beginn das Scannen durchgeführt, wobei das Licht bei einer Auflösung von 10 μm , ein PMT-Wert von 550 und 50 % Power gescannt wurde. Für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Dyomics wurde ein roter Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm eingesetzt. Zum Schluss wurden alle Daten von den gescannten Sondensignalen im Computer gespeichert, welche später für die Auswertung mit Hilfe einer entwickelten Microsoft Excel-Applikation am Fraunhofer IZI-BB verwendet werden. Diesen automatischen Auswertungsprogrammen ermöglichen die Arbeitsanstrengung und bzw. die Zeit zu reduzieren und gleichzeitig erleichtern sie die Bearbeitung und die Auswertung von der großen Datenmenge.

2.2.8.2. Bearbeitung und Auswertung der Daten

Für die Auswertung wurden alle gelieferten Daten aus dem GenePix-Scanner in einem erstellten Microsoft Excel Auswertdateifeil am Fraunhofer IZI-BB hineinkopiert. Das führte dazu, dass alle Rohdaten automatisch ausgelesen wurden. Die Rohdaten beinhalten dabei die reine Signalintensität und das Signal des Hintergrundes, welches von reiner Signalintensität abgezogen wurde und es zur Bildung von der Nettointensitäten kam. Die Rohdaten ergibt auch die Positionsangabe der Sondensignale, die in der Microsoft Excel-Applikation für jedes Subarrays und die dazu gehörigen Sonden zugeordnet sind. Die Auswertung eines Subarrays erfolgte hier gleich ab. Beim Spotten wurde jede Sonde zweimal pro Array gespottet. Demzufolge wurde aus zwei erzeugten Signalen einer Sonde ein Mittelwert berechnet, von dem die Standardabweichung bestimmt wurde. In dieser Arbeit gibt es für die Auswertung der Signalintensität insgesamt drei etablierten Kontrollkriterien, von deren Angaben die Sonden entweder als auswertbar bzw. nicht auswertbar bezeichnet wurden. Hierfür wurde zu Beginn aus dem Signal der jeweiligen negativen Hybridisierungskontrolle (NHK) und deren Standardabweichung das Detektionslimit (LOD, oder in Englisch: limit of detection) bestimmt und nach der folgenden Formel berechnet:

$$LOD = I_{NHK} + (3 * SD_{NHK})$$

In der Formel die I_{NHK} steht für die Intensität der Negativhybridisierungskontrolle und stellt die SD_{NHK} die Abkürzung von der Standardabweichung der Negativhybridisierungskontrolle

dar. Um dieses Kriterium (LOD) für eine Sonde als befriedigend berücksichtigt zu werden, muss der Intensität einer Sonde über das gerechnete Detektionslimit hinausgehen bzw. überschreiten. Hier ist noch wichtig zu erwähnen, dass die Berechnung des Detektionslimits für jede Sonde statt an dem Signal der negativen Hybridisierungskontrolle sehr Arbeitsaufwändiger wäre. Das zweite Kriterium ist die Standardabweichung, welche nicht größer als 30 % der Mittelwert der Nettointensität sein sollte. Wenn das Detektionslimit und die Standardabweichung für eine Nicht-SNP-Sonde erfüllen werden, wird diese Nicht-SNP-Sonde als auswertbar beurteilt. Weiterhin wurde für die Auswertung von SNP-Sonden noch ein weiteres Kontrollkriterium festgelegt.

Bei den SNP-Sonden handelt es sich dabei um *Single-Nucleotide Polymorphism* oder Punktmutationen, bei denen die Variationen einzelner Basenpaare innerhalb eines DNA-Strangs für einen Stamm nachgewiesen wurden und für die Identifikation von diesem Stamm verwendet wurden. Hierunter besteht ein SNP-Sondensatz immer aus vier Sonden, die in ihren Sequenzen fast identisch sind, abgesehen von einer einzelnen Base. Die variierte Base einer SNP-Sonde kann Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanosin sein. Bei der Auswertung von SNP-Sonden wurde die Sonde eines Sondensatzes, die das stärkste Signal gegeben hat, als *perfect match* oder (PM) bewertet. Alle anderen drei Sonden wurden als *miss match* oder (MM) bezeichnet, von denen sich der *miss match* mit dem stärksten Signal als *maximaler miss match* (MM_{\max}) ausgezeichnet wurde. Aus diesen Bestimmungen wurde zusätzlich das dritte Kontrollkriterium für SNP-Sonden gebildet, welches ein Verhältnis zwischen der MM_{\max} und der PM darstellt. Das MM_{\max} / PM -Verhältnis muss kleiner als 0,7 sein, um die Sonde als auswertbar einzuhalten. In Microsoft Excel-Applikation ließen sich diese Ergebnisse grafisch darstellen (siehe Anhang), wobei für SNP-Sonden aus der gemessenen absoluten Intensitäten normalisierte Werte berechnet. Hierunter wurde jeder Sondensatz auf die Intensität der PM-Sonde normalisiert. Es bleibt noch zu erwähnen, dass es immer einen Hintergrund mit mehreren Stämmen beim Scannen gab, so dass in diesem Fall das gesamte reine Sondensignal für jeden Stamm berücksichtigt wurde. Dies bedeutet, ohne das Signal des Hintergrundes zu subtrahieren. Die Entstehung von diesem Hintergrund-Phänomen könnte eventuell bei der weiteren Anpassung des Waschprotokolls reduziert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Amplifikation der Ziel-DNA mittels einer optimierten Multiplex-PCR

Das Hauptziel dieser Doktorarbeit war eine Multiplex-PCR zu etablieren, um die verwendeten Genfragmente gleichzeitig und in ausreichend hoher Konzentration zu amplifizieren. Anschließend wurden diese PCR-Produkte auf einem Microarray hybridisiert. Die Optimierung von einer Multiplex-PCR stellt immer wieder mehrere Schwierigkeiten und Hindernisse dar, da die Quantitäten und die Konzentrationen von allen verwendeten Komponenten optimal zusammengesetzt werden sollten und ausreichend für die Amplifikation von mehreren Genfragmenten im einzelnen PCR-Ansatz sein müssen. Aufgrund der Strukturvariationen der hier verwendeten Genfragmente (23S-rDNA mit 1840 bp, 16S-rDNA mit 1485 bp und *mecA*-Gen mit 364 bp) wurden mehrere PCR-Ansätze durchgeführt. Um am Ende ein effektives PCR-Protokoll zu optimieren, welches genauso für die Amplifikation aller möglichen Genfragmenten ausreichend wirken sollte.

Hierfür wurde pro Ansatz ein PCR-Komponente hinsichtlich der Menge und der Konzentration oder ein Parameter des verwendeten PCR-Programms variiert. Hierfür wurde zuerst eine Screening-PCR durchgeführt, bislang ein zufriedenstellendes Ergebnis erhalten wurde. Wenn eine erfolgreiche Screening-PCR für alle möglichen Stämme auftritt, kommt es dann zur Durchführung von der Markierungs-PCR. Für den Nachweis vom Erfolg eines PCR-Ansatzes wurden 2 µl der Screening-PCR bzw. 0,5 µl der Markierungs-PCR über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Die Dokumentation von allen Gelbildern wurde mittels des BioDocAnalyze (BDA)-Systems erfolgt, wobei die Kameraeinstellungen für optimale Bilddarstellung mehrfach getestet wurden. Hierfür wurden für die beste Dokumentation von allen Gelbildern eine Blendeneinstellung von 13/1, eine Belichtungszeit gleich 8 s und ISO-Wert von 100 sowie ein Emissionsmaximum von 520 nm genutzt. Da der verwendete PaqGreen-Farbstoff von Peqlab über ein Fluoreszenz-Emissionsmaximum von 530 nm verfügt, daher lassen sich die Gelbilder bei einem Emissionsmaximum von 520 nm anhand der Auswähle des BioDocAnalyze-Systems gut fotografisch dokumentieren.

Der erste durchgeführte Multiplex-PCR-Versuch in dieser Dissertation wurde mit Hilfe eines ersten Multiplex-PCR-Protokolls, welches im Rahmen einiger vorausgegangener Experimente bei der Arbeitsgruppe im Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie etabliert wurde.

Tabelle 7: Das erste PCR-Protokoll. Dies PCR-Protokoll mit PCR-Programm wurde in Arbeitsgruppe-Bier optimiert.

	Ausgangskonz.	Endkonz.	Pro Ansatz
DNA	5 ng/µl	0,80 ng/µl	2,00 µl
23S_DE_114_f	15 µM	0,20 µM	0,17 µl
23S_F_1923_r	15 µM	0,20 µM	0,17 µl
hpe 16S forward	15 µM	0,15 µM	0,13 µl
hpe 16S reverse	15 µM	0,15 µM	0,13 µl
mecA forward 4	15 µM	0,20 µM	0,17 µl
mecA reverse 1	15 µM	0,20 µM	0,17 µl
10x Taq buffer	10 x	1,00 x	1,25 µl
MgCl ₂	25 mM	2,00 mM	1,00 µl
dNTP-Mix (ohne dTTP)	10 mM	0,60 mM	0,75 µl
dTTP	10 mM	0,60 mM	0,75 µl
Taq polymerase	5 U/µl	0,40 U/µl	1,00 µl
Millipore-H ₂ O			4,83 µl
Gesamtvolumen			12,50 µl

T in °C	Zeit	40x
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	
50°C	30 sec	
72 °C	1.5 min	
72 °C	4 min	

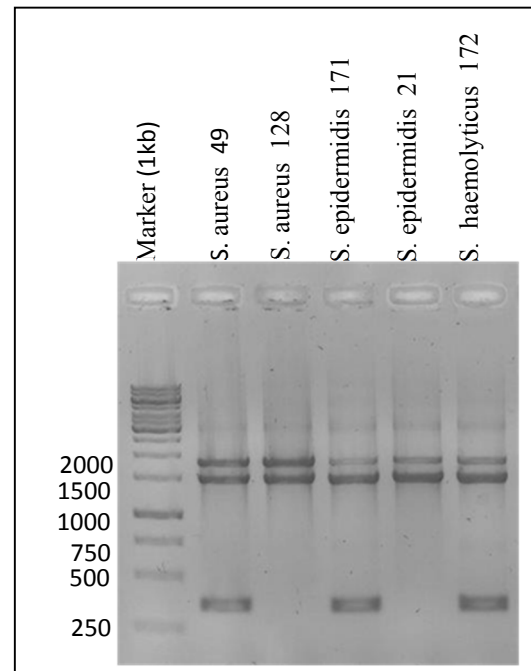


Abbildung 7: Gelelektrophorese der ersten Multiplex-PCR anhand von 5 Staphylokokken-Stämmen.

In der Abbildung 7 ist ein Gelelektrophoresebild für eine Multiplex-PCR, das mit dem oben gezeigten PCR-Protokoll in der Tabelle 7 durchgeführt wurde, zu beobachten, wobei das größte Genfragment 23S-rDNA mit 1840 bp für *S. epidermidis* (Stämme: 171 und 21) und *S. haemolyticus* (Stamm: 172) nur sehr schwache Bande abgebildet hat. Außerdem hat das *mecA*-Gen bei allen positiven Stämmen eine verminderte Ausbeute erzeugt. Im Gegensatz dazu ließ sich das 16S-rDNA bei gleichen Stämmen relativ bessere Amplifikation zeigen. Weiterhin konnten die 23S-rDNA- und 16S-rDNA-Gene bei den *S. aureus* Stämmen (49 und 128) vergleichsweise besser vervielfältigt werden. In den nächsten Experimenten zeigte das Protokoll mehrere Gelelektrophoresebilder, die nur sehr schwache Bande aller Gene spezielle das 23S-rDNA-Genfragment gezeigt haben. In dem nachfolgenden Experiment (siehe Abbildung 8), die mit dem oben gezeigten Protokoll in der Tabelle 7 aber mit gesteigerter DNA-Menge von 30 ng pro Ansatz durchgeführt wurde, konnten die 23S-rDNA-Genfragmente sowohl bei *S. epidermidis* Stämmen als auch bei *S. aureus* Stämmen kaum oder gar nicht amplifiziert werden. Andererseits haben die 16S-Genfragmente ebenfalls eine relative verminderte Amplifikation im Vergleich zum ersten Versuch (Abbildung 7) ergeben. In der Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die weitere Verwendung dieses Protokolls sinnlos ist und

neue Anpassungen an dieses Protokoll sind für eine zufriedenstellende Amplifikation der gewünschten Gene notwendig.

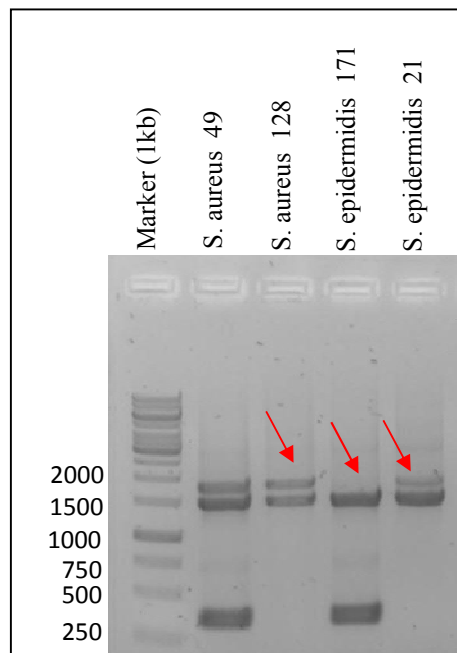


Abbildung 8: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. Das 23S-rDNA wurde für *S. epidermidis* Stamm überhaupt nicht oder kaum amplifiziert, zusätzlich zeigte die Stämme von *S. aureus* nur schwache 23S-rDNA Bande.

Zu Beginn wurde die Konzentration von *Taq*-Polymerase verifiziert, um eine bessere Amplifikation der allen gezielten Genen gleichzeitig bereitzustellen. In folgender Abbildung 9 ein Gelelektrophoresebild mit zwei Multiplex-PCR Ansätze, bei denen zwei verschiedene *Taq*-Polymerase Konzentrationen auf fünf Staphylokokken Stämme geprüft wurden. Zunächst wurde eine Konzentration von 0,4 U/ μ l pro Ansatz getestet, welche im Vergleich zu einer Konzentration von 0,2 U/ μ l eine bessere Ausbeute geliefert hat. Insbesondere hat das 23S-rDNA-Gen für *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* Stämmen mit einer *Taq*-Polymerase-Konzentration von 0,2 U/ μ l eine eindeutige verminderte Ausbeute ergeben. Die 16S-rDNA- und *mecA*-Gene haben gleichfall bei diesen Stämmen mit einer Konzentration von 0,2 U/ μ l eine geringere Amplifikation ermittelt. Zusätzlich zeigten die *S. aureus* Stämme ebenso eine verminderte Ausbeute bei einer *Taq*-Polymerase-Konzentration von 0,2 U/ μ l.

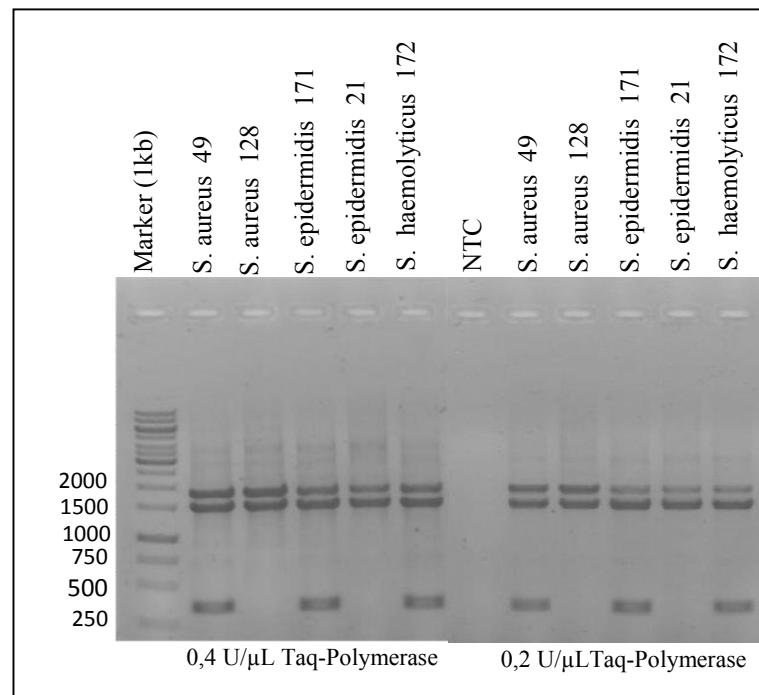


Abbildung 9: Gelelektrophorese einer Screening-PCR. Hier wurde die PCR mit zwei unterschiedlichen *Taq*-Polymerase Konzentrationen 0,4 U/µL bzw. 0,2 U/µl durchgeführt, wobei von jedem Stamm 2 µl auf dem Gel pipettiert wurden.

Im Schluss daran, wurde zusätzlich eine Konzentration von 0,3 U/µl getestet, um die beste *Taq*-Polymerase-Konzentration zu finden und zur Validierung ob das Verwenden von höherer *Taq*-Polymerase-Konzentration von 0,4 U/µl die Ausbeute vergleichsweise stark verbessern kann oder nicht. Hier ist es noch zu erwähnen, dass bei allen Versuchen eine Ausgangskonzentration von 5 U/µl *Taq*-Polymerase (Firma-Qiagen) pro Ansatz verwendet wurde. Der Hersteller hat aber eine Konzentration von 2,5 U *Taq*-Polymerase für Standard-PCR empfohlen. In der folgenden Abbildung 10 wurde die Ausbeute der zwei PCR Ansätze auf einem Gelelektrophoresebild dargestellt, wobei ein Ansatz 0,4 U/µl und den anderen 0,3 U/µl *Taq*-Polymerase-Konzentrationen aufweisen. Von diesem Gelbild kann man feststellen, dass eine hohe *Taq*-Polymerase Konzentration von 0,4 U/µL im Vergleich zu einer von 0,3 U/µl die Amplifikation nicht nennenswert beeinflusst wurde und es keinen großen Unterschied beim Ergebnis gab. In den nachfolgenden Experimenten, die verwendet wurden, um ein Multiplex-PCR-Protokoll zu optimieren, war die Amplifikation des 23S-rDNA-Genfragments sehr begrenzt. Darüber hinaus konnte die Amplifikation der kurzen Gene (16S-rDNA und *mecA*) einfach und schnell durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde dann eine erhöhte Primerkonzentration für das 23S-rDNA eingesetzt. In ersten Versuchen betrug die Primerkonzentration 0,20 µM für 23S-rDNA und *mecA*-Gen und 0,15 µM für 16S-rDNA-Gen. Hierunter wurden im Rahmen der Anpassung eines neuen PCR-Ansatzes 0,60 µM Primerkonzentration des 23S-rDNA-Gens und 0,40 µM Primerkonzentration der anderen

beiden Gene (16S-rDNA und *mecA*) getestet, weiterhin wurden Primerkonzentrationen von 0,70 μM und 0,80 μM für das 23S-rDNA untersucht. Demzufolge führte die Erhöhung von der Primerkonzentration zu einer wesentlichen Verbesserung der Ausbeute aller ermöglichen Gene, was besonders für das 23S-rDNA-Genfragment nützlich war.

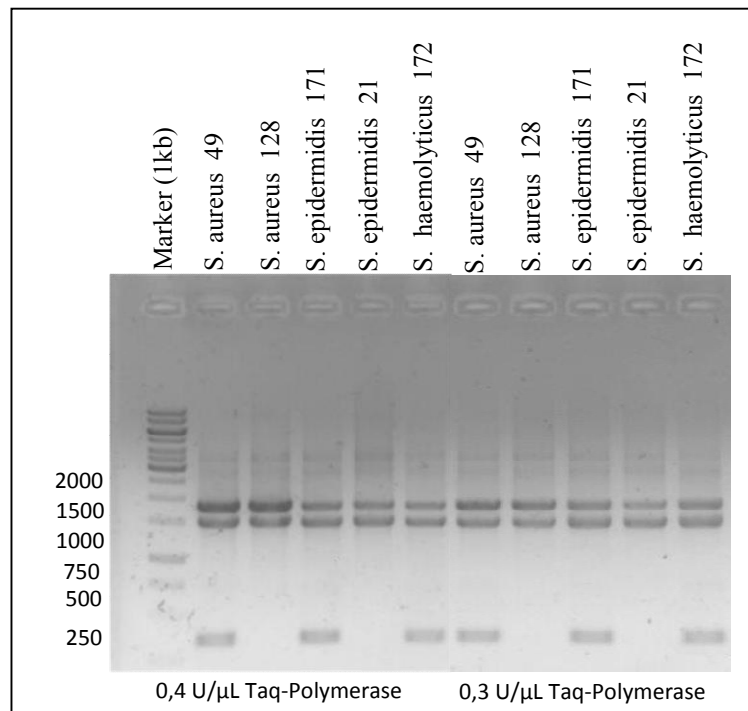


Abbildung 10: Gelelektrophorese einer Screening-PCR. Hier wurden zwei *Taq*-Polymerase Konzentrationen 0,4 U/ μL bzw. 0,3 U/ μl geprüft, wobei von jedem Stamm 2 μl auf dem Gel aufgetragen wurden.

Aus diesem Grund wurde hier ein Verhältnis für alle verwendeten Primerpaare festgelegt, bei denen 2 Teile vom 23S-rDNA-Primerpaar zu 1 Teil von den Primerpaaren der beiden anderen Gene (16S-rDNA und *mecA*) pro Ansatz verwendet wurden.

Neben der Primerkonzentration wurden auch mehrere Konzentrationen des *Taq*-Puffers getestet, wobei im ersten Versuch eine *Taq*-Pufferkonzentration von 1,00 x (Abbildung 11) getestet wurde. Im zweiten Versuch wurde eine verminderte Konzentration von 0,80 x (Abbildung 12) getestet. Der Grund dafür ist, dass die Primerpaare mit großem Produkt der Amplifikation (hier: 23S-rDNA) bei einer reduzierten Pufferkonzentration besser wirken können als bei einer erhöhten Pufferkonzentration. Im Allgemeinen funktionieren die Primerpaare mit einer erhöhten Pufferkonzentration (26) mit einem kurzen Produkt der Amplifikation (hier: *mecA* und 16S-rDNA) besser. Darüber hinaus wurden hier zusätzlich verschiedene *Taq*-Pufferkonzentrationen von 1,50 x, 0,60 x und 0,70 x getestet, was zur vollständigen Verhinderung der Amplifikation vom 23S-rDNA führte (Gelbilder nicht gezeigt).

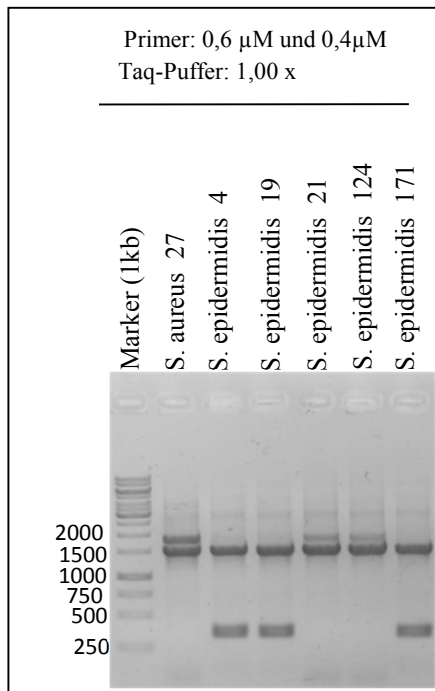


Abbildung 11: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. mit Primerkonzentration von 0,6 μM (23S-rDNA) und 0,4 μM (16S-rDNA und *mecA*) sowie eine Taq-Puffer-Konzentration von 1,00 x.

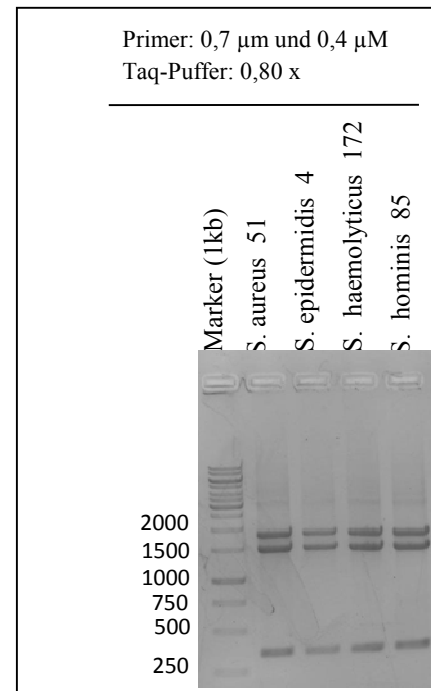


Abbildung 12: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. mit Primerkonzentration von 0,7 μM (23S-rDNA) und 0,4 μM (16S-rDNA und *mecA*) sowie eine Taq-Puffer-Konzentration von 0,80 x.

In der Abbildung 11 ist zu beobachten, dass die Amplifikation der 23S-rDNA-Genen besonders bei positiven *S. epidermidis* Stämmen (4, 19, 21, 124 und 171), bei denen das *mecA*-Gen positiv ist, selten oder gar nicht aufgetreten werden konnte. Im Gegensatz dazu ergaben die *mecA*- und 16S-Gene eine relativ gute Ausbeute bei derartigen Stämmen.

Außerdem zeigte die Abbildung 12 ein Gelelektrophoresebild, welches zu einem Triplex-PCR-Ansatz gehört. Hierunter wurde sich das Ergebnis durch die Verdopplung der Primerkonzentrationen des 23S-rDNA Gens und die Verminderung des Taq-Puffers auf einen Wert von 0,8 x signifikant verbessert. Im Übrigen lieferten die kurzen Gene (*mecA*- und 16S-rDNA) ebenfalls ein befriedigendes Ergebnis bei diesem Ansatz.

Um das gewünschte Ergebnis zu erreichen, wurden weitere Komponenten und Parameter des PCR-Programms angepasst. Zu diesem Zweck wurden insbesondere die dNTPs und die Elongationstemperatur sowie die Elongationszeit in Betracht gezogen.

Die dNTPs werden eindeutig als wichtige Komponente der PCR identifiziert. Von daher wurden hier vor allem Mengen von 0,40 mM und 0,60 mM dNTPs pro Ansatz überprüft. In der Abbildung 13 zeigt ein Gelelektrophoresebild der zwei PCR-Ansätze, wobei eine dNTPs-Konzentration von 0,40 mM im ersten Ansatz und bzw. eine Konzentration von 0,60 mM im zweiten Ansatz getestet wurden. Außerdem wurde die doppelte Menge Mastermix

vorab von jedem Ansatz vorbereitet. Folglich wurde die Hälfte jedes Ansatzes durch eine Elongationstemperatur von 72 °C in einer PCR-Maschine gelaufen lassen und die andere Hälfte desselben PCR-Ansatzes gleichzeitig in einer anderen PCR-Maschine bei einer Elongationstemperatur von 68 °C erfolgt. Bei dem Gelbild konnte man feststellen, dass die Amplifikation aller Stämme bei einer dNTPs-Konzentration von 0,4 mM besser als die Amplifikation bei hoher dNTPs-Konzentration von 0,6 mM stattfand. Darüber hinaus konnte das 23S-rDNA in *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* bei einer reduzierten Elongationstemperatur von 68 °C gegenüber zu einer Elongationstemperatur von 72 °C besser amplifiziert werden.

Der Grund für das erfolgreiche Ergebnis könnte durch die Verringerung der Balance zwischen dNTPs und MgCl₂ erläutert werden, welche für den optimalen Effekt von *Taq*-Polymerase notwendig ist. Zusätzlich zu den bereits an dNTPs und DNA gebundenen Magnesiumionen benötigt die *Taq*-Polymerase auch freie Magnesiumionen für die beste Verfahrensweise. Dies erklärte, warum eine Zunahme der dNTPs-Konzentration wahrscheinlich schnell zur Verhinderung der PCR führen konnte (26). Es ist noch anzumerken, dass die Verwendung von einer verminderten Elongationstemperatur von 68 °C die Amplifikation des großen Gens (23S-rDNA) weitgehend positiv beeinflusst hat.

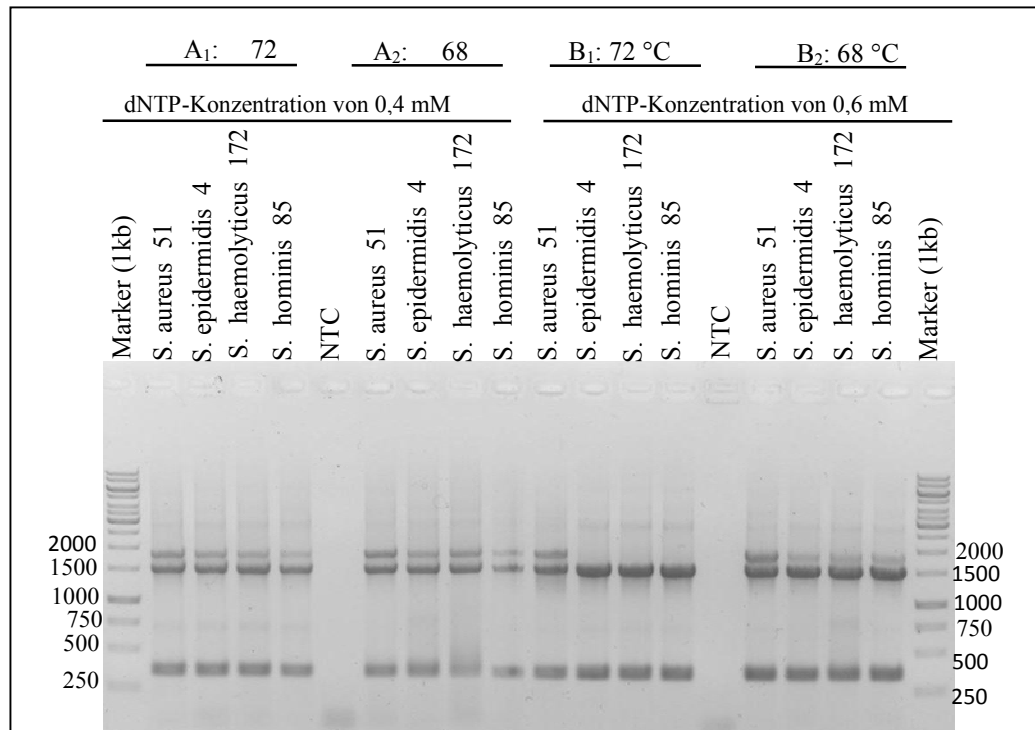


Abbildung 13: Gelelektrophorese einer PCR. Zwei PCR-Ansätze A und B, wobei der erste Ansatz 0,4 mM dNTPs aufwies und der zweite Ansatz 0,6 mM dNTPs pro Ansatz enthielt. Außerdem wurde jeden PCR-Ansatz einmal durch eine Elongationstemperatur von 72 °C amplifiziert und einmal bei 68 °C Elongationstemperatur gleichzeitig in einer anderen PCR-Maschine ausgeführt.

Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis eines Gelelektrophoresebilds, wobei zwei PCR-Ansätze darüber aufgetragen sind. Die Stämme des ersten Ansatzes wurden durch eine Elongationstemperatur von 65 °C amplifiziert, wohingegen wurde die Durchführung des zweiten PCR-Ansatzes durch eine Elongationstemperatur von 68 °C erfolgt.

Aus diesem Gelbild ist aufzufassen, dass die weitere Verminderung von der Elongationstemperatur auf 65 °C für alle eingesetzten Stämmen keine Verbesserung der Ausbeute brachte, aber es hat sich gezeigt, dass alle Gene bei einer Elongationstemperatur von 68 °C erfolgreich amplifiziert werden können. In der Abbildung 14 zeigten die *S. epidermidis*-, *S. haemolyticus*- und *S. hominis*-Stämme für das 23S-rDNA-Genfragment bei einer Elongationstemperatur von 65 °C nur schwachen Banden.

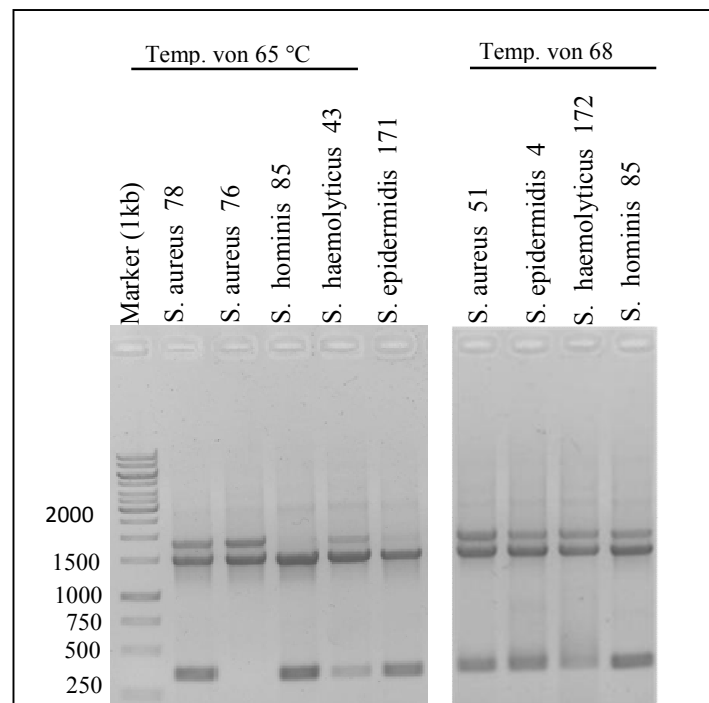


Abbildung 14: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR. Der erste Ansatz wurde durch eine Elongationstemperatur von 65 °C durchgeführt und bzw. der zweite Ansatz durch Elongationstemperatur von 86 °C.

Ein weiterer Entwicklungsschritt bestand darin, die Erhöhung der Elongationszeit von 90 s (1,5 min) im ersten verwendeten Protokoll auf 120 s (2 min) in den nachfolgenden Versuchen. Da es in der Regel 1 min Elongationszeit pro 1000 bp berechnet wird (25), war es zweckmäßig eine Elongationszeit von 2 min zu nutzen. Dementsprechend hat das 23S-rDNA mit 1840 bp die ausreichende Verlängerungszeit, um eine gute Amplifikation zu ermitteln.

Zwei Gelelektrophoresebilder in der Abbildung 15 bzw. in der Abbildung 16 wurden dargestellt, die es sich um zwei Multiplex-PCR-Ansätze mit zwei variierten Elongationszeiten

handelt. Wobei in der Abbildung 16 eine Elongationszeit von 90 s eingesetzt wurde, die im Vergleich zu einer Elongationszeit von 120 s (in der Abbildung 15) eine verminderte Ausbeute besonders für das 23S-rDNA-Gen bei *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* Stämmen gezeigt hat.

Des Weiteren wurde die $MgCl_2$ Ionen immer in einer Konzentration von den 3,5 Mm pro Ansatz eingesetzt. Zusätzlich zu den 1,5 Mm $MgCl_2$ Ionen, die in dem verwendeten *Taq*-Polymerase Kit von Qiagen bereits vorhanden sind, wurde eine Menge von 2 Mm $MgCl_2$ Ionen hinzugegeben. In allen Experimenten wurde die Ziel-DNA auf eine Konzentration von 30 ng/ μ l verdünnt bzw. 1 μ l pro Ansatz verwendet. Abschließend wurde das Restvolumen bis zu einem Gesamtvolumen von 12,5 μ l pro Ansatz mit Reinst-Wasser aufgefüllt.

Die Zusammenfassung aller Anpassungen und Optimierungsschritte, die in Rahmen der Verbesserung der Ausbeute durchgeführt wurden, fand in Form der Zunahme aller verwendeten Prime bzw. Verdopplung der Primerkonzentration für 23S-rDNA-Gen im Vergleich zu anderen getesteten Genen, Verminderung der *Taq*-Puffer, der *Taq*-Polymerase- und dNTPs-Konzentrationen und Erhöhung der Elongationszeit sowie der Einsatz von verminderter Elongationstemperatur statt. An dieser Stelle kann man sagen, dass bis dahin der optimierte Screening-PCR-Ansatz gute Ergebnisse für alle verwendeten Stämme vermittelt hat.

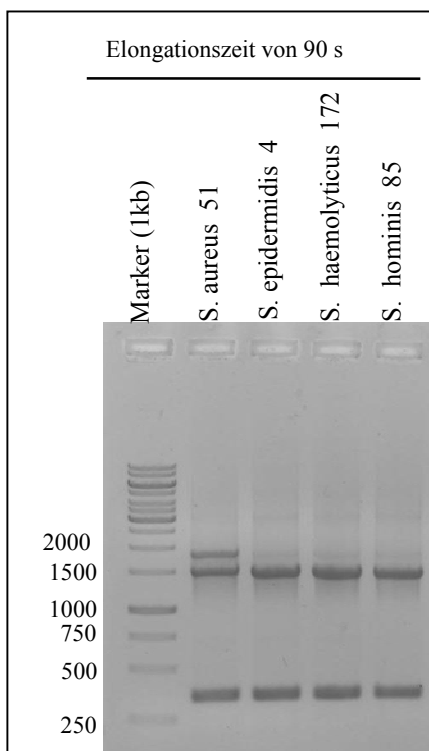


Abbildung 16: Gelelektrophoreses einer PCR. Elongationszeit von 90 s.

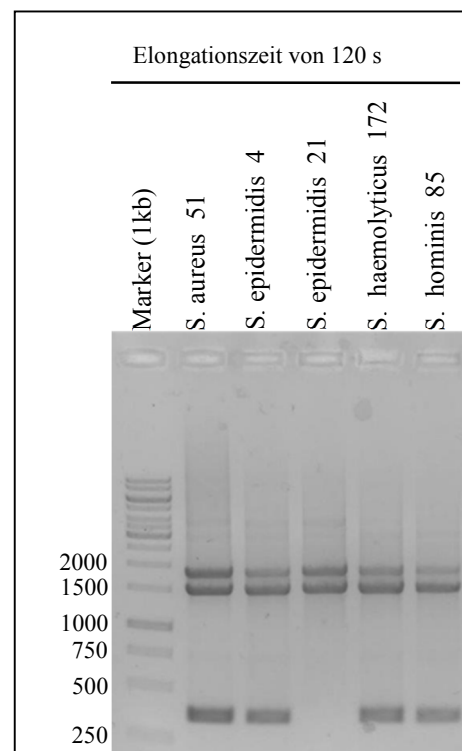


Abbildung 15: Gelelektrophorese einer PCR. Elongationszeit von 120 s.

Das Ziel aller in dieser Arbeit durchgeführten Optimierungsschritte war es, die Amplifikation der erwünschten Gene gleichzeitig und in ausreichend hoher Konzentration bereitzustellen, hierbei hat die Amplifikation des 23S-rDNA-Genfragments in einer Multiplex-PCR insbesondere bei *S. epidermidis*-, *S. haemolyticus*-, *S. hominis*-, *S. simulans*-, *S. capitis*-, *S. cohnii*-, *S. warneri*- und *S. auricularis*-Stämmen immer große Schwierigkeiten und Hindernisse gezeigt. Aus diesem Grund ist die meisten Arbeitsaufwand auf die Erhöhung dieser begrenzten Amplifikation vom 23S-rDNA (1840 bp) fokussiert, was abschließend in Rahmen der oben beschriebenen Optimierungsschritte durch mehrere Screening-PCR-Ansätze und mit verschiedenen Staphylokokken-Stämmen erfolgreich erreicht werden konnte. Das neue optimierte PCR-Protokoll und das zugehörige PCR-Programm wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst, wobei die neu optimierten Komponenten und Parameter in der Tabelle 8 gelb markiert sind.

Tabelle 8: Das neue optimierte PCR-Protokoll. Mit PCR-Programm, wobei alle gelb markierte Felder neu etabliert wurden.

	Ausgangskonz.	Endkonz.	Pro Ansatz
DNA	30 ng/µl	2,40 ng/µl	1,00 µl
23S_DE_114_f	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
23S_F_1923_r	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
hpe 16S forward	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
hpe 16S reverse	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
mecA forward 4	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
mecA reverse 1	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
10x Taq buffer	10 x	0,80 x	1,00 µl
MgCl ₂	25 mM	2,00 mM	1,00 µl
dNTP-Mix (ohne dTTP)	10 mM	0,40 mM	0,50 µl
dTTP	10 mM	0,40 mM	0,50 µl
Taq polymerase	5 U/µl	0,30 U/µl	0,75 µl
Millipore-H ₂ O			6,42 µl
Gesamtvolumen			12,50 µl

T in °C	Zeit	
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	40x
50 °C	30 sec	
68 °C	2 min	
68 °C	4 min	

3.2. Markierungs-PCR

Nachdem die Amplifikation aller gewünschten Genprodukte in einer Screening-PCR erfolgreich stattgefunden hat, wurden als nächstes die Implementierungsschritte von einer Multiplex-Markierungs-PCR durchgeführt. In einer Markierungs-PCR wurde im Gegensatz zu einer Screening-PCR ein Fluoreszenz-Markierungsfarbstoff verwendet. Die

Fluoreszenzmarkierung der DNA ist in dieser Arbeit ein unumgänglicher Schritt, um die erhaltene Signale beim Scannen optisch auslesen zu können. In den hier durchgeführten Versuchen wurde der Farbstoff Dy647P1 von Firma Dyomics eingesetzt, der ein relativ preiswerter Farbstoff ist und eine spektrale Wirkung ähnlich dem Cy5-Farbstoff aufweist. Hierfür wurde der optimierte Multiplex-PCR-Ansatz erneut angepasst, bei dem ein Verhältnis von 3 Teilen dTTP zu 2 Teilen Dy647P1-dUTP verwandt wurde. Das bedeutet, dass an stelle 0,4 mM dTTP, hierunter 0,24 mM dTTP und 0,16 mM Dy647P1-dUTP eingesetzt wurden. Das Verhältnis sollte ausreichend sein, damit der Farbstoff in die DNA eingebaut werden kann, da nicht alle Thyminbasen markiert werden müssen. Im Gegensatz dazu kann es eine vollständige Markierung der Nukleotiden zur sterischen Behinderung in der DNA-Fragment kommt, so dass die Amplifikation verhindert werden könnte. In der Tabelle 9 wurde der neu etablierte Markierungs-PCR-Ansatz dargestellt und die zusätzlichen variierten PCR Komponenten wurden ebenfalls in gelb markiert.

Tabelle 9: Das optimierte Multiplex-Markierungs-PCR-Protokoll mit PCR-Programm.

	Ausgangs-konz.	End-konz	Pro Ansatz
DNA	30 ng/µl	2,40 ng/µl	1,00 µl
23S_DE_114_f	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
23S_F_1923_r	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
hpe 16S forward	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
hpe 16S reverse	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
mecA forward 4	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
mecA reverse 1	30 µM	0,40 µM	0,17 µl
10x Taq buffer	10 x	0,80 x	1,00 µl
MgCl ₂	25 mM	2,00 mM	1,00 µl
dNTP-Mix (ohne dTTP)	10 mM	0,40 mM	0,50 µl
dTTP	10 mM	0,24 mM	0,30 µl
DY-647P1-dUTP	1 mM	0,16 mM	2,00 µl
Taq polymerase	5 U/µl	0,30 U/µl	0,75 µl
Millipore-H ₂ O			4,62 µl
Gesamtvolumen			12,50 µl

T in °C	Zeit	40x
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	
68 °C	2 min	
68 °C	4 min	

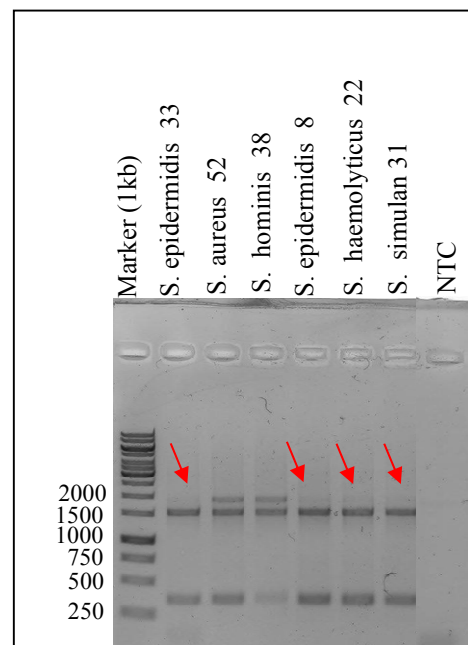


Abbildung 17 : Gelelektrophorese einer Multiplex-Markierungs-PCR. Hier wurde das 23S-rDNA bei mehreren Stämmen nicht amplifiziert.

Bei der Markierungs-PCR Versuchen tauchten auch immer wieder das Phänomen auf, welches die Amplifikation vom 23S-rDNA-Genfragment bei *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans* und *S. warneri* Stämmen nur schwach bzw. gar nicht in ausreichend Konzentration amplifiziert werden konnte. In der Abbildung 17 ein Gelelektrophoresebild

einer Markierungs-PCR zu erkennen, indem die Amplifikation das größte Genfragment (23S-rDNA mit 1840 bp) bei mehreren Stämmen gar nicht funktionierte, außerdem konnte die *S. aureus* Stämme in der Triplex-Markierungs-PCR wie bei der Screening-PCR bevorzugt amplifiziert werden. Dementsprechend war es hier notwendig, dass das Ergebnis jeder Markierungs-PCR zunächst auf ein Gelelektrophoresebild überprüft werden sollte. Nach dem Gelergebnis wurde entschieden, ob für die jeweiligen Stämme eine Monoplex-Markierungs-PCR angeschlossen werden musste. Hierbei wurden 0,5 µl von der Multiplex- bzw. Monoplex-Markierungs-PCR über eine Gelelektrophorese aufgetrennt, das restliche Volumen von 12 µl wurde vollständig aufgereinigt und anschließend für die Hybridisierung auf dem Mikroarray verwendet.

In der folgenden Tabelle 10 ist ein Monoplex-PCR-Ansatz zu finden, dabei nur die Amplifikation des 23S-rDNA-Genprodukts durchgeführt wurde. Dazu sollte das Verhältnis von dTTP und Dy647P1-dUTP zusätzlich reduziert werden, so dass es für einen Monoplex-Ansatz nur mit einem einzigen Genprodukt geeignet ist. Daneben zeigte dem Gelelektrophoresebild in der Abbildung 18 einen erfolgreichen durchgeführten Monoplex-PCR-Ansatz für das 23S-rDNA-Genfragment bei mehreren entsprechenden Staphylokokken-Stämmen.

Tabelle 10: Das optimierte Monoplex-Markierungs-PCR-Protokoll für das 23S-rDNA.

	Ausgangskonz.	Endkonz.	Pro Ansatz
DNA	5 ng/µl	1,20 ng/µl	3,00 µl
23S_DE_114_f	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
23S_F_1923_r	30 µM	0,80 µM	0,33 µl
10x Taq buffer	10 x	0,80 x	1,00 µl
MgCl ₂	25 mM	2,00 mM	1,00 µl
dNTP-Mix (ohne dTTP)	10 mM	0,15 mM	0,19 µl
dTTP	10 mM	0,09 mM	0,11 µl
DY-647P1-dUTP	1 mM	0,06 mM	0,75 µl
Taq polymerase	5 U/µl	0,10 U/µl	0,25 µl
Millipore-H ₂ O			5,53 µl
Gesamtvolumen			12,50 µl

T in °C	Zeit	40x
95 °C	15 min	
95 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	
68 °C	2 min	
68 °C	4 min	

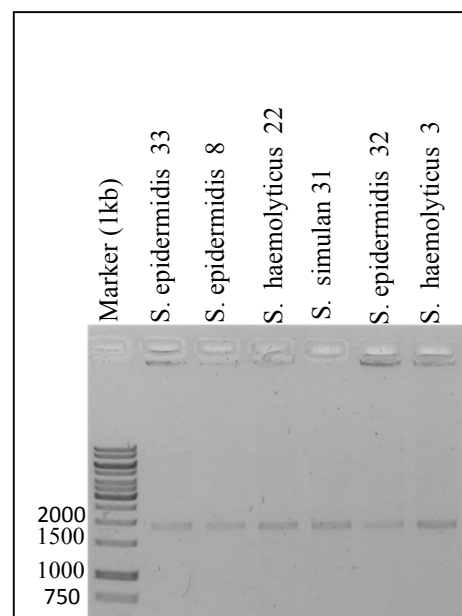


Abbildung 18: Gelelektrophoresebild einer Monoplex-Markierungs-PCR. Hier wurde nur das 23S-rDNA bei den betreffenden Stämmen amplifiziert.

3.3. Hybridisierung, Scannen und Auswertung

Als die Amplifikation der DNA in einer Multiplex-Markierungs-PCR erfolgreich durchgeführt wurde, wurden die DNA-Proben anschließend aufgereinigt. Bei der Aufreinigung wurden die Triplex bzw. die Monoplex-Markierungs-PCR eines Stamms miteinander vermischt. In der Folge wurden die Konzentrationen der DNA und des Farbstoffes in dreifacher Bestimmung mittels Nanodrop etabliert. Anhand der ermittelten Mittelwerte der DNA-Konzentration (Nanodrop-Datei) lassen sich die DNA-Volumen und die DNase-Menge des Verdauungsansatzes im Bezug auf der 600 ng eingesetzte DNA-Konzentration automatisch in der MS Excel-Applikation berechnen. Abgesehen von den NTCs der PCR, diese wie erwartet, geringe Mengen an DNA aufweisen können, wurden 600 ng DNA von allen 166 getesteten Stämmen eingesetzt, wohingegen es nur 300 ng von den NTCs der PCR eingesetzt werden konnten. Die Verdauung und die Hybridisierung sowie das Scannen wurden immer in dieser Arbeit am gleichen Tag hintereinander durchgeführt. Genauso wurden die erhaltenden Quantifizierungssignale beim Scannen in einer CSV-Datei gespeichert, damit sie später in einer entwickelten Microsoft Excel-Applikation am Fraunhofer IZI-BB hineinkopiert und einfach bearbeitet werden.

Zur Auswertung und Bearbeitung der Sondensignale wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Kontrollkriterien verwendet. Zunächst wurde das Detektionslimit (LOD) aus dem Mittelwert der jeweiligen negativen Hybridisierungskontrolleintensität (NHK) plus der dreifachen Standardabweichung berechnet. Um ein Sondensignal als positiv einzuhalten, muss es zuerst oberhalb des Detektionslimits (LOD) liegen. Das zweite Kriterium handelt es sich dabei um die Standardabweichung (SD) des Sondensignals, die nicht größer als 30 % der Mittelwert des Gesamtsignals sein darf. Damit ein Signal einer Nicht-SNP-Sonde als positiv ausgewertet werden kann, müssen die beiden oben genannten Kontrollkriterien (*LOD* und *SD*) erfüllt sein. Bei SNP-Sonden muss noch ein weiteres Verhältnis zwischen MM_{\max} (*maximaler miss match*) und der *PM* (*perfect match*) berücksichtigt werden. Wenn das MM_{\max} / PM -Verhältnis unterhalb von 0,7 liegt, so dass das Kriterium erfüllt ist. Hierbei ist noch zu erwähnen, dass eine SNP-Sonde als nicht auswertbar bewertet wurde, wenn mindestens eines der drei Kontrollkriterien nicht erfüllt war.

In der nachfolgenden Tabelle 11 sind alle Hybridisierungsergebnisse der durchgeführten Versuche zusammengefasst, weiterhin sind die Stämme sowohl mit ihrer internen Nummerierung vom Fraunhofer IZI-BB als auch mit ihrer externen Nummerierung vom RKI dargestellt. Darüber hinaus wurde angegeben, ob nur eine Triplex-Markierungs-PCR für jeweiligen Stamm durchgeführt wurde oder eine zusätzliche Monoplex-Markierungs-PCR insbesondere für das 23S-rDNA-Genfragment mit 1840 bp erforderlich war. In der Tabelle 11 sind zudem das Vorhandensein vom Resistenzgen (*mecA*) und die Einbaurrate R angegeben. Des Weiteren wurde die Auswertung aller Sondensignale eingeschlossen. Die Tabelle zeigt auch, ob die Spezies und die Resistenz korrekt identifiziert wurden. Die Sonden, die in rot geschrieben sind, stellen die 23S-rDNA-Gen Sonden dar, ebenso stehen die Sonden in schwarz für 16S-rDNA-Gen. Außerdem sind Sonden in blau auf dem *mecA*-Gen basierende Sonden. Hierunter wurde der Farbcode für die Bewertung der Sondensignale schließlich in der Tabelle 11 eingefügt. Wenn mindestens eines der drei Kontrollkriterien nicht erfüllt wurde, galt die relevante SNP-Sonde als nicht auswertbar, diese wurde in diesem Fall in der Tabelle grau markiert. In der Tabelle weisen alle grünen Felder korrekt positive Sondensignale auf, im Gegensatz dazu zeigen alle Felder, die in rot dargestellt wurden, falsche positive Sondensignale. Ebenfalls repräsentieren die blauen Felder die korrekt negative Sondensignale und stehen die Felder in gelb für falsch negative Sondensignale. Es bleibt zu erwähnen, dass die weißen Felder unter der Sonde Sau227i kein Hybridisierungsergebnis symbolisieren, da die Sonde Sau227i beim Spotten der letzten Slides versehentlich weggelassen wurde und daher die Hybridisierung dieser Sonde mit den entsprechenden Stämmen nicht stattgefunden hat.

In dieser Dissertation wurden die Sonden wie bereits erwähnt in SNP- und Nicht SNP-Sonden diskriminiert. Für jede SNP-Sonde gibt es einen Sondensatz, wobei die vier Sondensequenzen eines Sondensatzes in nur einer Base (A, G, T oder C) variieren. Kam es zu einer komplementären Bindung einer DNA mit einer SNP-Sonde eines Sondensatzes, so wurde diese als *perfect match* (PM) bewertet. Es ist in der Tabelle 11 der jeweils *perfect match* (PM) eines Sondensatzes auch angegeben.

	+	38	12-02047	T	T	T	130											A	T	T			C	G		+		
	+	39	12-02111-2	M	T	T	430																		G		+	
	+	50	12-02364	T	T	T	1135																		G		+	
	+	152	12-03820	M	T	T	69																		G		+	
	+	154	12-03842-3	M	T	T	53																		G		+	
	-	164	12-04496	M	T	-	72													A	C					G		+
	+	183	13-00645	M	T	T	54																			G		+
	-	192	13-02058	M	T	-	49																				G	
+	197	13-03283	M	T	T	44																				G		+
<i>S. lugdunensis</i>	+	46	12-02275	T	T	T	559																				+	
	+	73	12-02810-3	M	T	T	152														C				C		+	
	-	159	12-03939-1	T	T	-	83														C						+	
	-	165	12-04502	T	T	-	74														C						+	
-	195	13-02491-1	T	T	-	47															C					+		
<i>S. sciuri</i>	+	1	12-00055	T	T	T	584																				-	
	+	35	12-01969	T	T	T	101												A	C							+	
	+	55	12-02407	T	T	T	102																				+	
	+	151	12-03738	T	T	T	90																		C		+	
	+	191	13-02056	T	T	T	73																				+	
	+	198	13-03352	T	T	T	77																				+	
	+	203	12-03738	T	T	T	46																				+	
	-	204	14-03470	T	T	T	40																				+	
<i>S. warneri</i>	k	42	12-02218	T	T	k	106																		A	C	+	
	+	68	12-02757	M	T	T	428																			A	+	
	-	189	13-02053	T	T	-	43																				+	
	+	196	13-02733-2	M	T	T	49															C	A			A	+	
<i>S. capitis</i>	+	199	13-03930-2	M	T	T	45																			A	+	
	-	179	13-00237	M	T	-	61															C	C		T	G	+	
	-	182	13-00641	M	T	-	82																		C	G	+	
	-	188	13-01164	T	T	-	51																				-	
	-	190	13-02055	M	T	-	56													A		C	C		C	G	+	
<i>S. saprophyticus</i>	-	194	13-02339	M	T	-	48																			C	G	+
	-	10	12-00675	T	T	-	184																				+	
	-	180	13-00414-1	T	T	-	57																				+	
	-	205	15-00778	T	T	-	48																				-	
<i>S. pseudintermedius</i>	-	206	12-00248	T	T	-	296																				+	
	-	104	12-03098	T	T	-	308																		C		+	
	+	111	12-03185	T	T	T	85																		C		+	
<i>S. cohnii</i>	+	112	12-03205	T	T	T	86																			C	+	
	-	178	13-00234	T	T	-	60																				+	
	+	201	14-03162	M	T	T	51																				+	
<i>S. auricularis</i>	+	202	14-03164	M	T	T	43																				+	
	-	185	13-00846	M	T	-	55																			G	-	
	-	187	13-01159-1	M	T	-	50																				+	
<i>S. equorum</i>	-	200	13-04316-2	T	T	-	54																				-	
<i>S. simulans</i>	+	31	12-01608	M	T	T	121																			T	G	+
<i>S. xylosum</i>	-	181	13-00415	T	T	-	61																			C	+	

Richtig positiv

Richtig negativ

nicht auswertbar

korrekt

Falsch positiv

Falsch negativ

nicht durchgeführt

nicht korrekt

In der Tabelle 11 ist es deutlich zu erkennen, dass alle Kontrollsonden (EUB338, HPE343 und HPE907), welche komplementär zu hochkonservierten Bereichen der 16S-rDNA der Bakterien sind, wie erwartet korrekt positive Signale für alle getestete Stämme ergaben. Ferner ist anzumerken, dass die Ergebnisse von NHK (negative Hybridisierungskontrolle) und PHK (positive Hybridisierungskontrolle) in der Tabelle 11 nicht enthalten sind. Diese haben immer die erwarteten Signale erzeugt, das heißt, negative Signale mit der NHK bzw. positive Signale mit der PHK. Zunächst wurde es hier auf die Ergebnisse der Nicht-SNP-Sonden

eingegangen. Die Sonde Sspp1414i zeigte korrekt positive Signale mit den verschiedenen Staphylokokken-Stämmen, insbesondere zählen hier die Stämme *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. capitis* und *S. auricularis* dazu. Anderenfalls gaben die Stämme *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. pseudintermedius*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. simulans* und *S. xylosus* mit der Sonde Sspp1414i korrekt negative Signale an. Darüber hinaus reagierte die Sonde Sau227i auf die meisten *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme korrekt positiv, wohingegen ergab sie mit den restlichen Sonden stets ein korrekt negatives Signal. Hier ist noch zu erwähnen, dass diese Sonde während des Spottens der zuletzt verwendeten Objektträger vergessen wurde. Daher konnte sie unglücklicherweise nicht in den jeweiligen Stämmen ausgewertet werden. Weiterhin lieferten die *S. aureus* spezifischen Sonden Sau69i und Sau69i_GAT immer ein korrekt positives Signal für jeden *S. aureus*-Stamm, hingegen zeigten diese Sonden nur für die *S. epidermidis* 17- und *S. hominis* 38-Stämme ein falsch positives Signal an. Diese beiden Stämme zeigten auch mit allen restlichen Sonden, ein ähnliches Ergebnis wie *S. aureus*-Stämme. Es könnte davon ausgegangen werden, dass die Stämme *S. epidermidis* 17 und *S. hominis* 38 möglicherweise durch das Robert Koch Institut (RKI) falsch sortiert wurden. In der Tabelle 11 wurde weiteres beobachtet, dass die Sonde Sau69_AGC korrekt positiv auf ein *S. auricularis*-, *S. simulans*-Stamm und *S. epidermidis*-, *S. hominis*-, *S. capitis*-Stämme reagierte. Diese Sonde ergab immer für alle *S. aureus*-Stämme ein korrekt negatives Signal. Zusätzlich zu den zwei erwähnten Stämmen *S. epidermidis* 17 und *S. hominis* 38, die mit allen verwendeten Sonden ein Ergebnis wie *S. aureus*-Stämme lieferten, es sei angemerkt, dass die Sonde Sau69_AGC noch ein negatives Signal für ein *S. capitis*-Stamm zeigte.

Die *S. epidermidis* spezifischer Sonde Sep1498 reagierte stets korrekt positiv auf *S. epidermidis*-Stämme und korrekt negativ auf *S. aureus*-Stämme sowie auf die restlichen getesteten Stämme. Diese Sonde wies aber für ein *S. haemolyticus*-Stamm und ein *S. capitis*-Stamm ein falsch positives Signal auf. Die *S. haemolyticus* spezifische Nicht-SNP-Sonde Sha158i brachte immer ein korrekt positives Signal mit den *S. haemolyticus*-Stämmen und ein korrekt negatives Signal mit den *S. aureus* und *S. epidermidis*-Stämmen, hingegen wies sie ein falsch positives Signal für ein *S. aureus*-Stamm, *S. hominis*- und *S. auricularis*- und drei *S. warneri*-Stämme auf. Ebenso gab die andere *S. haemolyticus* spezifische Sonde Sha193 sowohl für *S. haemolyticus*-Stämme als auch für die *S. hominis*- und *S. auricularis*-, *S. lugdunensis*-, *S. saprophyticus*-, *S. cohnii*-, und drei *S. warneri*-Stämme sowie ein *S. capitis*-Stamm, *S. equorum* und *S. xylosus* positives Signal an. Es bleibt noch zu erwähnen, dass die Sha193 Sonden auch immer ein korrekt negatives Signal mit den *S. aureus*- und *S.*

epidermidis-Stämmen erzeugte. Die Sonden *mecA_I-X* und *mecA_XI* wurden für die Identifikation vom *mecA*-Gen eingesetzt. Diese zeigten für jeden Stamm abgesehen von fünf Stämmen das erwartete korrekt positive bzw. korrekt negative Signal an.

Die SNP-Sonden wurden in der Tabelle 14 grau markiert, wenn ihre Signale als nicht auswertbar bewertet wurden. Das bedeutet in diesem Fall, dass mindestens eines der drei verwendeten Kontrollkriterien nicht erfüllt wurde. Zu Beginn ist wichtig zu erwähnen, dass die SNP-Sonden *Sau191i*, *Sau230i*, *Sau231i* und *Sep195i* nur für *S. aureus* und *S. epidermidis* spezifische Sonden sind, aus diesem Grund wurden sie bei übrigen Stämmen als nicht auswertbar oder falsch positiv gewertet. Die Sonde *Sau191i_A* zeigte ein korrekt positives Signal für die meisten *S. aureus*-Stämme, jedoch wurden 10 von 78 *S. aureus*-Stämmen als nicht auswertbar bewertet. Diese Sonde ergab außerdem ein falsch positives Signal für zwei *S. epidermidis*-, zwei *S. hominis*-Stämme, ein *S. sciuri*- und ein *S. capitis*-Stamm. Für *S. epidermidis*-Stämme konnte die Sonde *Sau191i* kein deutlicher *Perfect match* bei der Hybridisierung erzielen. Die Sonde *Sau230i_T* reagierte immer korrekt positiv auf alle MSSA- und MRSA-Stämme, bis auf zwei Stämme, diese konnten nicht ausgewertet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Sonde *Sau230i_C* ein korrekt positives Signal für alle *S. epidermidis*-Stämme. Es ist noch zu beachten, dass die Sonde *Sau230i_C* häufig falsch positiv Signal auf die meisten eingesetzten Stämme reagierte. Ebenfalls reagierte die Sonde *Sau231i_T* korrekt positiv auf alle *S. aureus*-Stämme, bis auf fünf Stämme, bei denen die Kontrollkriterien nicht erfüllt waren. Anschließend gab es die Sonde *Sau231i_C* ein korrekt positives Signal für alle *S. epidermidis*-Stämme und ein falsch positives Signal für vier *S. capitis*-Stämme und ein *S. haemolyticus*-Stamm. Darüber hinaus gab der SONDENSATZ *Sep195i* mit *perfect match Sep195i_C* stets ein korrekt positives Signal für insgesamt alle *S. aureus*-Stämme und mit *perfect match Sep195i_T* ein korrekt positives Signal für alle *S. epidermidis*-Stämme an. Die Sonde *Sep195i_C* zeigte ein falsch positives Signal für verschiedene acht Stämme und ein *S. aureus* Stamm war dazu nicht auswertbar. Ebenfalls zeigte die Sonde *Sep195i_T* ein falsch positives Signal mit nur vier zusätzlichen Stämmen. Die Sonde *Sep1472_G* gab es immer ein falsch positives Signal für jeden Stamm, d.h. in den negativen Hybridisierungskontrollen und auch in den NTCs der PCR. Diese Sonde besitzt kein in Bakterien natürlich vorkommendes Komplement. Da die Signale auch in den NTCs auftraten, wo die einzige DNA dem Komplement der positiven Hybridisierungskontrolle (HybCon) hinzugegeben wurde. Es konnte angenommen werden, dass diese Sonde eine Kreuzhybridisierung mit der HybCon (Hybridisierungskontrolle) aufweist. Diese Sonde wurde in der Tabelle 11 bei allen Versuchen als nicht auswertbar gewertet. Die Sonde

Shaem66i konnte bei keiner der Hybridisierung mit *S. aureus*-Stämmen eine deutliche *perfect match* erzeugen, wohingegen gab es ein korrekt positives Signal für alle *S. epidermidis*-Stämme, bis auf zwei *S. epidermidis* waren nicht auswertbar. Die Sonde Shaem66i_G zeigte dazu ein falsch positives Signal mit allen *S. hominis*-, vier *S. capitis*-Stämmen, einem *S. auricularis*- und *S. simulans*-Stamm. Der SONDENSATZ Sheam66i mit *perfect match* A (Shaem66i_A) reagierte wie erwartet mit der *S. haemolyticus*-Stämmen immer korrekt positiv. Es bleibt zu erwähnen, dass die Sonde Shaem66i_A ein falsch positives Signal für drei *S. Warneri*-Stämme lieferte. Mit dem testen von der Sonde Shaem66i_A im SILVA Probe Match und Evaluation Tool wurde festgestellt, das nur ein miss match ausreicht, um *S. Warneri*-Stämme daneben zu detektieren. In der Folgenden Tabelle 12 ist die aktuelle Spezifität der verwendeten Sonden nach der Auswertung aller SONDENSIGNALE der 166 getesteten Stämme aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Aktuellen SONDENSPEZIFITÄT.

Sonden	Nicht SNP-Sonden		SNP-Sonden			
	positiv	negativ	A	G	C	T
Sspp1414i	<i>S. aureus</i>	<i>S. sciuri</i>				
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>				
	<i>S. hämolyticus</i>	<i>S. pseudointermedius</i>				
	<i>S. hominis</i>	<i>S. equorum</i>				
	<i>S. warneri</i>	<i>S. simulans</i>				
	<i>S. capitis</i>	<i>S. xylosus</i>				
	<i>S. lugdunensis</i>					
	<i>S. auricularis</i>					
Sau227i	<i>S. aureus</i>	<i>S. hämolyticus</i>				
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>				
		<i>S. warneri</i>				
		<i>S. capitis</i>				
		<i>S. auricularis</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
		<i>S. saprophyticus</i>				
		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. simulans</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
	<i>S. cohnii</i>					
Sau69i	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>				
		<i>S. hämolyticus</i>				
		<i>S. hominis</i>				
		<i>S. warneri</i>				

		<i>S. capitis</i>				
		<i>S. auricularis</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
		<i>S. saprophyticus</i>				
		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. simulans</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
		<i>S. cohnii</i>				
Sau69i-GAT	<i>S. aureus</i>	<i>S. hominis</i>				
		<i>S. warneri</i>				
		<i>S. capitis</i>				
		<i>S. auricularis</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
		<i>S. saprophyticus</i>				
		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. simulans</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
		<i>S. cohnii</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
		<i>S. cohnii</i>				
Sau69-AGC	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>				
	<i>S. hominis</i>	<i>S. hämolyticus</i>				
	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>				
	<i>S. simulans</i>	<i>S. auricularis</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
		<i>S. saprophyticus</i>				
		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
	<i>S. cohnii</i>					
Sep1498	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>				
		<i>S. hämolyticus</i>				
		<i>S. hominis</i>				
		<i>S. capitis</i>				
		<i>S. simulans</i>				
		<i>S. warneri</i>				
		<i>S. auricularis</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
	<i>S. saprophyticus</i>					

		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
		<i>S. cohnii</i>				
Sha158i	<i>S. hämolyticus</i>	<i>S. aureus</i>				
	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>				
	<i>S. auricularis</i>	<i>S. capitis</i>				
		<i>S. simulans</i>				
		<i>S. warneri</i>				
		<i>S. lugdunensis</i>				
		<i>S. sciuri</i>				
		<i>S. saprophyticus</i>				
		<i>S. pseudointermedius</i>				
		<i>S. equorum</i>				
		<i>S. xylosus</i>				
		<i>S. cohnii</i>				
Sha193	<i>S. hämolyticus</i>	<i>S. aureus</i>				
	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>				
	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. capitis</i>				
	<i>S. warneri</i>	<i>S. simulans</i>				
	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. sciuri</i>				
	<i>S. auricularis</i>	<i>S. pseudointermedius</i>				
	<i>S. equorum</i>					
	<i>S. xylosus</i>					
	<i>S. cohnii</i>					
Sau191i			<i>S. aureus</i>			
Sau230i					<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
					<i>S. hämolyticus</i>	
					<i>S. lugdunensis</i>	
					<i>S. sciuri</i>	
					<i>S. warneri</i>	
					<i>S. capitis</i>	
					<i>S. saprophyticus</i>	
					<i>S. pseudointermedius</i>	
					<i>S. cohnii</i>	
					<i>S. equorum</i>	
				<i>S. xylosus</i>		

					<i>S. capitis</i>	
Sau195i					<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
					<i>S. capitis</i>	<i>S. simulans</i>
Shaem66i			<i>S. hämolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>		
			<i>S. warneri</i>	<i>S. hominis</i>		
				<i>S. capitis</i>		
				<i>S. simulans</i>		

4. Diskussion

4.1. Etablierung und Optimierung einer Multiplex-PCR

Diese Doktorarbeit zielt darauf ab, die verschiedenen Staphylokokken-Stämme durch die 23S-rDNA- und 16S-rDNA-Gene zu identifizieren und zu unterscheiden sowie in allen untersuchten Stämmen das Vorhandensein des Resistenzgens (*mecA*-Gen) nachzuweisen. Zu diesem Zweck war die Amplifikation der Ziel-DNA mittels einer optimierten Multiplex-Markierungs-PCR der Schlüsselschritt zur Hybridisierung dieser amplifizierten DNA-Moleküle auf einem DNA-Microarray. In Rahmen dieser Experimente wurde die Etablierung von einer Screening-Multiplex-PCR für die Genamplifikation aller getesteten Stämme erfolgreich erzielt, im Gegensatz dazu konnte das größten 23S-rDNA Genfragment in einer Multiplex-Markierungs-PCR bei *S. epidermidis*-, *S. haemolyticus*-, *S. hominis*-, *S. simulans*-, *S. capitis*-, *S. cohnii*-, *S. warneri*- und *S. Auricularis*-Stämmen nicht amplifiziert werden. Aus diesem Grund wurde für das 23S-rDNA Genfragment bei diesen betreffenden Stämmen eine zusätzliche Monoplex-Markierungs-PCR durchgeführt. Es sollte auch erwähnt werden, dass die Amplifikation der Ziel-DNA bei *S. aureus*-Stämmen sowohl in einer Multiplex-Screening-PCR als auch in einer Multiplex-Markierungs-PCR in einer hohen Konzentration leicht und schnell erreicht werden konnte, weshalb nur die Multiplex-PCR durchgeführt wurde. Um einen optimierten Multiplex-PCR-Ansatz für die Genamplifikation aller eingesetzten Stämme in dieser Arbeit zu schaffen, war es zunächst notwendig, dass mehrere Entwicklungs- und Optimierungsschritte durchgeführt wurden. Hierzu wurde die *Taq-Polymerase* Konzentration in mehreren Ansätzen validiert, um die beste Konzentration der *Taq-Polymerase* zu finden, die ein zufriedenstellendes Ergebnis liefern kann, ohne dabei irgendeine überflüssige Menge des Enzymes zu verschwenden. Die *Taq-Polymerase* muss in einer ausreichenden Konzentration für die potentielle Verlängerung aller entsprechenden DNA-Moleküle eingesetzt und bis zum Ende der PCR zur Verfügung gestellt werden. Hierbei wurde für alle durchgeführte PCR eine Konzentration von 0,30 U/μl verwendet. Es bleibt

noch zu erwähnen, dass es keinen großen Unterschied bei der Ausbeute mit einer zunehmenden *Taq*-Polymerase-Konzentration von 0,4 U/ μ l gab. Zusätzlich erfordert die *Taq*-Polymerase der Zugabe von zweiwertigen Ionen als Kofaktor um die Inkorporation der dNTPs-Ionen in der neuen DNA-Molekülen zu ermöglichen. Die hier verwendete $MgCl_2$ Ionen führt zur Bildung eines löslichen Komplexes mit den dNTPs in der Lösung und zum richtigen Einbau durch die Polymerase. Hierfür wurde immer das $MgCl_2$ Ionen in einer Konzentration von 3,5 mM pro Ansatz eingesetzt. Weiterhin wurden die dNTPs-Ionen getestet, damit sie keinen limitierenden Faktor für PCR werden. Die dNTPs muss ebenfalls in einer ausreichenden Konzentration für den Aufbau der neuen DNA-Moleküle vorhanden sein. In der Screening-PCR wurde eine Konzentration von 0,40 mM für dNTPs-Mix (ohne dTTP) und dTTP genutzt. Wohingegen wurde in der Markierungs-PCR eine Konzentration von 0,40 mM für dNTPs-Mix (ohne dTTP) und eine Konzentration von 0,24 mM statt 0,40 mM für dTTP etabliert. Dabei wurde zunächst eine erhöhte dNTPs-Konzentration von 0,60 mM genutzt, welche die Ausbeute der PCR stark reduzierte. Die dNTPs und $MgCl_2$ Ionen sind für die optimale Wirkung der *Taq*-Polymerase notwendig. Der Anstieg der Menge an dNTPs kann die freien Magnesiumionen, die für beste Auswirkung der *Taq*-Polymerase nötig ist, reduzieren. Was die Verbesserung des Ergebnisses mit einer verringerten dNTPs-Konzentration von 0,40 mM gegenüber 0,60 mM erklären könnte.

Die dNTPs wurden jeweils in einer Menge von 30 μ l hergestellt, dann wurden in drei Eppis in einer Menge von 10 μ l aufgeteilt und abschließend bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert. Da es festgestellt wurde, dass das mehrfache Auftauen und Einfrieren die Wirksamkeit der dNTPs reduzieren könnte Henegariu O *et al* (26). Die verwendeten drei Primerpaare und ihre geeigneten Anlagerungstemperaturen wurden in dieser Arbeit am Fraunhofer IZI-BB über ein webbasiertes Analyse Tool ermittelt. Die Anlagerungstemperatur für die Primerpaare des *mecA*-Gens und des 23S-rDNA-Gens ist sehr gering. Da diese beiden Primerpaare aufgrund ihrer hohen Spezifität sehr kurz sind, ist eine niedrige Anlagerungstemperatur von $45\text{ }^\circ\text{C}$ geeignet. Während das Primerpaar für das 16S-rDNA-Gen mit einer Anlagerungstemperatur von $50\text{ }^\circ\text{C}$ signifikant höher ist. Als nächstes wurden die Primerverhältnisse in einer einzelnen PCR-Reaktion zueinander angepasst. Aufgrund der Strukturvariation der erwünschten Gene zeigte die Amplifikation des größten 23S-rDNA Genfragments mit 1840 bp immer viele Schwierigkeiten im Vergleich zu beiden anderen Genen. Somit sollte eine erhöhte Menge an Primerpaar für das 23S-rDNA-Genfragment verwendet werden. Abschließend wurde ein Primerverhältnis etabliert, wobei 2 Teile Primerpaare des 23S-rDNA Genfragments $0,80\text{ }\mu\text{M}$ zu einem Teil Primerpaar von beiden anderen Gene (16S-rDNA- und *mecA*-Genfragmenten)

0,40 μM verwendet wurden. Infolge dessen wurde das Ergebnis von aller Gene insbesondere das 23S-rDNA-Genfragment ersichtlich verbessert. Darüber hinaus wurde die Taq-Pufferkonzentration in mehreren Experimenten verifiziert, um die beste Ausbeute für die drei getesteten Gene gleichzeitig zu erhalten. Schließlich wurde eine Taq-Pufferkonzentration von 0,80 x für alle Gene gut funktioniert. Es ist noch zu erwähnen, dass eine erhöhte Taq-Pufferkonzentration die Amplifikation von kurzen Genen positiv beeinflusst hat, während die Amplifikation des großen Gens beträchtlich verringert hat und umgekehrt. Dies bestätigt die Angaben von Henegariu O *et al* (26). Es wird auch bestätigt, dass die Verwendung einer verringerten Elongationstemperatur von 68 ° C statt 72 ° C die Genamplifikation insbesondere das 23S-rDNA-Genfragment wesentlich verbessert wurde. Ein weiterer Einstellungsschritt des PCR-Programms, ist die Erhöhung der Elongationszeit von 90 s auf 120 s zu nennen, was die Elongation des 23S-rDNA-Genfragments weitgehend bewerkstelligt hat.

Abschließend lässt sich sagen dass die Optimierung einer Multiplex-Markierungs-PCR in Verlauf dieser Dissertation zum großen Teil gelungen ist. Da die Amplifikation von allen möglichen Genen in den *S. aureus*-Stämmen und in anderen getesteten Stämmen (siehe Tabelle 1) in einer Triplex-Markierungs-PCR erfolgreich erreicht werden konnte. Wenn dies nicht der Fall war, wurde eine zusätzliche Monoplex-PCR für das 23S-rDNA-Gen bei den entsprechenden Stämmen durchgeführt.

4.2. Hybridisierung der Ziel-DNA auf einem DNA-Microarray

Nachdem die Ziel-DNA aller Stämme in der Markierungs-PCR vervielfältigt wurde, wurden diese PCR-Produkte auf einem Microarray hybridisiert. Anschließend wurden die markierten Ziel-DNA der Farbstoff mittels eines Laserscanners angeregt. Als nächstes wurde nach der Auswertung der ermittelten Scandaten entschieden, ob ein Stamm erfolgreich hybridisiert wurde oder nicht. In der Tabelle 11 kann gezeigt werden, dass die Kontrollsonden (EUB338, HPE343 und HPE907) wie erwartet immer positive Signale ergaben. Es ist noch anzumerken, dass die Kontrollsonde HPE907 generell immer ein relativ schwaches Signal im Vergleich zu anderen Kontrollsonden gezeigt hat. Dies könnte auf die niedrige Schmelztemperatur der Sonde von 44,8 ° C zurückführen, die unterhalb der in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungstemperatur liegt. Weiterhin wurde festgestellt, dass nur die Sonde Sep 1472_G immer ein falsch positives Signal lieferte. Bei der Sonde Sep1472_G gab immer ein gutes positives Signal, das heißt, mit allen Stämmen und sowohl in der Negativhybridisierungskontrolle als auch in NTCs der PCR. Es wurde angenommen, dass eine Kreuzhybridisierung durch die HybCon für diese Signale verantwortlich ist. Da die

Sonde Sep1472_G ein gutes Signal in den NTCs der PCR zeigte, welche nur die DNA das Komplement der positiven Hybridisierungskontrolle aufweisen. Darüber hinaus sind die Sequenzen der verwendeten HybCon und der Sep1472_G Sonde nahezu identisch und sie unterscheiden sich nur durch zweimal drei Basenpaarung mittig in ihrer Sequenz. Dieser Sondensatz wurde daher als nicht auswertbar in allen Versuchen bewertet, unabhängig davon ob die drei Kontrollkriterien erfüllt waren. Die Sonde Shaem66i_G gab stets für *S. aureus*-Stämme kein eindeutiges *perfect match* Signal, da allemal eines der drei Kontrollkriterien nicht erfüllt wurde. Deshalb wurde sie konsequent als nicht auswertbar beurteilt, so dass die Sonden Sep1472 und Shaem66i für den Nachweis von *S. aureus*-Stämme nicht geeignet sind. Im Gegensatz dazu reagierte die Sonde des Sondensatzes Shaem66i wie erwartet zuverlässig auf die *S. epidermidis*- und *S. haemolyticus*-Stämme. Der SNP-Sondensatz Sau191i war in der Lage, die *S. aureus* von den anderen Stämmen zu unterscheiden, da sie nur auf die alle *S. aureus*-Stämme reagieren konnte und ohne ersichtlichen Grund kein Hybridisierungsergebnis mit *S. epidermidis* gezeigt wurde. Es sei noch angemerkt, dass die Nicht SNP-Sonde Sau227i ein positives Signal nur für *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme zeigte, wodurch diese Sonde die beide Stämme von *S. haemolyticus*-Stämmen sowie von anderen Stämmen unterscheiden konnte. Weiterhin lieferten die *S. aureus* spezifischen SNP-Sonden Sau69i und Sau69i_GAT wie erwartet ein korrekt positives Signal für die meisten *S. aureus*-Stämme. Ebenfalls ergaben die *S. aureus* spezifischen Nicht-SNP-Sonden Sau230i, Sau231i und Sep195i Erwartungsgemäß zuverlässige positive Signale für die *S. aureus*-Stämme, wobei der Sondensatz Sep195i in allen Versuchen das konstante Ergebnis geliefert hat. Für den Nachweis von *S. epidermidis* sind alle Sonden mit Ausnahme des Sondensatzes Sau191i geeignet. Im Falle der nicht-SNP-Sonden ist es auffällig, dass die Sonde Sep1498i gegenüber der Sonde Sau69_AGC auf die *S. epidermidis*-Stämme bessere reagierte. Auch die SNP-Sondensätze Sau320i, Sau231i, Sep195i und Shaem66i reagierten wie erwartet auf die *S. epidermidis*-Stämme, wobei der Sondensatz Sau230i immer ein falsch positives Ergebnis mit den *S. haemolyticus*-Stämmen und den meisten Referenzstämmen gezeigt hat. Da die hier verwendeten SNP-Sonden nur zur Identifizierung der drei Stämme *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* dienen, können die anderen als Referenzstämmen bezeichnet werden. Die Sondensätze Sau230i und Sau231i sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich, aber die Sonden des Satzes Sau230i sind längere als die Sonden des Satzes Sau231i und weisen daher mehr CG-Gehalt auf. Somit weisen die Sonden des Satzes Sau230i eine höhere Schmelztemperatur im Bereich von 57,1 °C für *S. aureus*- bis 59,9 °C für *S. epidermidis*-Stämme auf, die sowohl höhere Signale als auch höhere Fehlpaarung-Signale während der Hybridisierung erzeugen

könnten. Die Sonde Sau231i_C zeigte viel weniger falsch positive Signale mit den *S. haemolyticus*-Stämmen und den Referenzstämmen und guter Signalen für *S. epidermidis*-Stämme als die Sonde Sau230i_C, so dass die Sonde Sau230i_C für den Nachweis von *S. epidermidis*-Stämmen nicht sinnvoll ist. Es bleibt noch zu erwähnen, dass die Nicht-SNP-Sonden Sha158i und Sha193 immer korrekt negative Signale für *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme zeigten, wodurch man *S. haemolyticus*-Stämme mit positiven Signalen von *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämmen identifizieren kann. Die Sonde Sha158i hat aufgrund ihrer Schmelztemperatur von 46,8 °C, die unter der in dieser Dissertation verwendeten Hybridisierungstemperatur von 48 °C liegt, stetig ein schwaches Signal im Vergleich zu der Sonde Sha193 gezeigt. Die Sonden Sha158i und Sha193 ergaben hier jedoch immer ein positives Signal nicht nur für die *S. haemolyticus*-Stämme, sondern auch für andere Referenzstämmen. Nachdem Ergebnis ist ersichtlich, dass die SNP-Sonde Shaem66i_A am besten geeignet ist, um die *S. haemolyticus*-Stämme von für *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme sowie von den meisten anderen Stämmen zu unterscheiden.

Für die Detektion des Resistenzgens sind die *mecA*_I-X- und *mecA*_XI-Sonden vorgesehen, doch sollte noch berücksichtigt werden, dass das *mecA*-Gen mit dem SCC-*mec* XI-Typ dem *mecC*-Gen homolog entspricht. Allerdings waren hier dabei die *mecA*_I-X- und *mecA*_XI-Sondensignale, wie erwartet, immer negativ oder positiv. Mit Ausnahme von fünf Referenzstämmen, bei denen das Ergebnis nicht wie erwartet war. Dabei weisen die meisten Stämme das *mecA*-Gen mit dem SCC-*mec* I-X-Typ auf.

Bei der Hybridisierung konnten bis zu 10 Stämme, eine Negativkontrolle und eine Hybridisierungskontrolle gleichzeitig auf einer Glasslide getestet werden, was in kurzer Zeit zur Identifizierung von mehreren Stämmen führte. Weiterhin betrug die verwendete Konzentration der Ziel-DNA immer 600 ng, das bedeute etwa 200 ng für jedes Genabschnitt. Demzufolge könnte ein PCR-Ansatz für zwei oder drei Hybridisierungen ausreichend sein. Die Hybridisierung der alle DNA-Fragmente 23S-rDNA, 16S-rDNA und *mecA* wurden mit dieser DNA-Konzentration von 200 ng erfolgreich verlaufen, da hier die Signale auswertbar waren und die relevanten Stämme korrekt identifiziert werden konnten. Darüber hinaus konnte die Resistenz in Bezug auf dem Vorhandensein des *mecA*-Gens nachgewiesen werden.

Zum Schluss hat diese optimierte Methode, die es sich um den Nachweis und die Charakterisierung von Antibiotika-resistenten Staphylokokken mittels Multiplex-PCR und DNA-Microarray handelt, alle *S.aureus*-Stämme erfolgreich korrekt identifiziert. Weiterhin konnte das Vorhandensein vom *mecA*-Gen die MRSA-von MSSA-Stämmen unterscheiden und zeigte sich noch, ob das *mecA*-Gen ein *mecA*_I-X- oder *mecA*_XI-Gen ist. Des Weiteren

konnte diese Methode andere Stämme insbesondere die *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*- und *S. hominis* Stämme detektieren und ebenfalls konnte das *mecA*-Gen bei *S. epidermidis*-, *S. haemolyticus*- und *S. hominis* -Stämmen sowie den anderen relevanten Stämmen identifiziert werden.

Es ist noch zu erwähnen, dass die klassischen kulturbasierte Methoden immer noch die Goldstandard Verfahren zum Nachweis von MRSA sind. Jedoch dauert eine Kultur ein bis drei Tagen bis zum Vorliegen des Endergebnisses. Aber bietet eine Anzucht auf dem chromogenem MRSA-Selektivagar höhere Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur derzeitigen MRSA-Schnellteste basierte Methoden an. Bei derzeitigen Nachweismethoden von MRSA tritt häufig das Problem auf, dass es immer eine hohe Rate des falsch positiven Ergebnisses spezielle für *S. epidermidis*-Stämme gibt. Aus diesem Grund muss jedes Ergebnis immer kulturell untersucht werden, was es zu einer großen Verzögerung bei der Ermittlung der Diagnose und die geeignete Behandlung kommen kann. Die hier optimierte Methode konnte diesem Problem vollständig entgehen, da sich die *S. Aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme mittels spezifischer gespotteter Sondensequenzen auf DNA-Microarray unterscheiden, die nur exakt an der komplementären DNA-Sequenz (23S-rDNA oder 16S-rDNA) der entsprechenden Bakterien binden. Nach der Hybridisierung der Sonde mit der Ziel-DNA auf einem Microarray, müssen die erzeugten Sondersignale mehrere Kontrollkriterien erfüllen, damit sie als positiv bewertet werden können. Die Verwendung des Microarray-Assays in der mikrobiologischen Diagnostik zielt darauf ab, ein neues Verfahren zu entwickeln. Dies wie die kulturbasierten Methoden diese kostengünstig ist und weist eine hohe Spezifität und Sensitivität auf. Des Weiteren strebt der Einsatz vom Mikroarray an, die Nachweiszeit von mehreren Tagen auf wenige Stunden oder sogar Minuten zu verkürzen. Insbesondere ist die iVD-Plattform vom Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie eines der aktuellen Detektionssysteme als Beispiel zu erwähnen, die in der Hoffnung auf der baldigen Zukunft für eine schnelle und effektive Diagnose von verschiedenen Krankheiten und Infektionen zur Verfügung steht.

4.3. Erläuterung aller Hybridisierungsergebnisse mittels eines Flussdiagramms

Das Flussdiagramm in der Abbildung 19 wurde im Bezug auf das Hybridisierungsergebnis (siehe Tabelle 11) erstellt, hierbei lassen sich laut dieser Hybridisierungsergebnisse vier Stämme (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis*) voneinander sowie von den restlichen relevanten Stämmen unterscheiden. Bei der Auswertung von den SNP- und Nicht-SNP-Sondensignalen aller getesteten Stämme, müssen zunächst die Kontrollkriterien (Unterschreitung des Detektionslimits, eine Standardabweichung größer als 30% des Gesamtsignals und/oder ein MM_{\max}/PM -Verhältnis größer 0,7) erfüllt werden, um die Sondensignale eines Stamms als auswertbar bzw. positiv einzuhalten. Im folgenden Flussdiagramm kann ein Stamm am Ende detektiert werden, wenn den erzeugten Sondensignalen für diesen Stamm die erwarteten Signale (positiv oder negativ) korrekt entsprechen. Es ist noch anzumerken, dass es für jeden Stamm mehrere Sonden als auswertbar angesehen werden können, so dass die Sonden Parallel d.h. ohne Abhängigkeit ausgewertet wurden. Wenn eine Sonde negativ oder nicht auswertbar ist, könnten die Anderen Sonden den relevanten Stamm identifizieren. Dies bedeutet, dass entweder mehrere Sonden oder nur eine Sonde zur Detektion eines Stamms führen kann, wenn diese Sonden immer ein konstantes Ergebnis für diesen Stamm ergibt. Zunächst müssen die Kontrollsonden (EUB338, HPE343 und HPE907), die auf die Bakterien im Allgemeinen reagieren sollen, positive Signale zeigen. Dann erfolgt die Sonde Sspp1414i, die Positiv auf verschiedene Staphylokokken-Stämme inklusiv die vier gesuchten Staphylokokken-Stämme in diesem Flussdiagramm reagierte. Wenn die Sonde Sspp1414i negativ ist, kann es sein, dass der Stamm wahrscheinlich nicht zu den vier gesuchten Stämmen gehört. Es ist noch zu erwähnen, dass die Sonde Sspp1414i bei mehreren Staphylokokken-Stämmen negativ war. In diesem Fall gilt der Stamm dann als nicht erkennbar. Wenn die Sonde Sspp1414i positiv ausfällt, geht der Auswertungsprozess zur nächsten Sonde über. Die Sonde Sau227i zeigte ein positives Signal für *S. aureus* und *S. epidermidis*, so dass diese Sonde verwendet werden könnte, um diese beiden Stämme von *S. haemolyticus* sowie von den anderen Stämmen zu unterscheiden. Wenn diese Sonde positiv ist, setzt die Auswertung mit den nächsten Sonden fort. Folglich erfolgten im Flussdiagramm die *S. epidermidis* spezifischen Sonden Sep1498, Sep195i_T, Sau69_AGC, Shaem66i_G, Sau231i_C und Sau230i_C von denen die SNP-Sonde Sep195i_T und die Nicht-SNP-Sonde Sep1498 die höheren positiven Sondensignale für die *S. epidermidis*-Stämme ergaben.

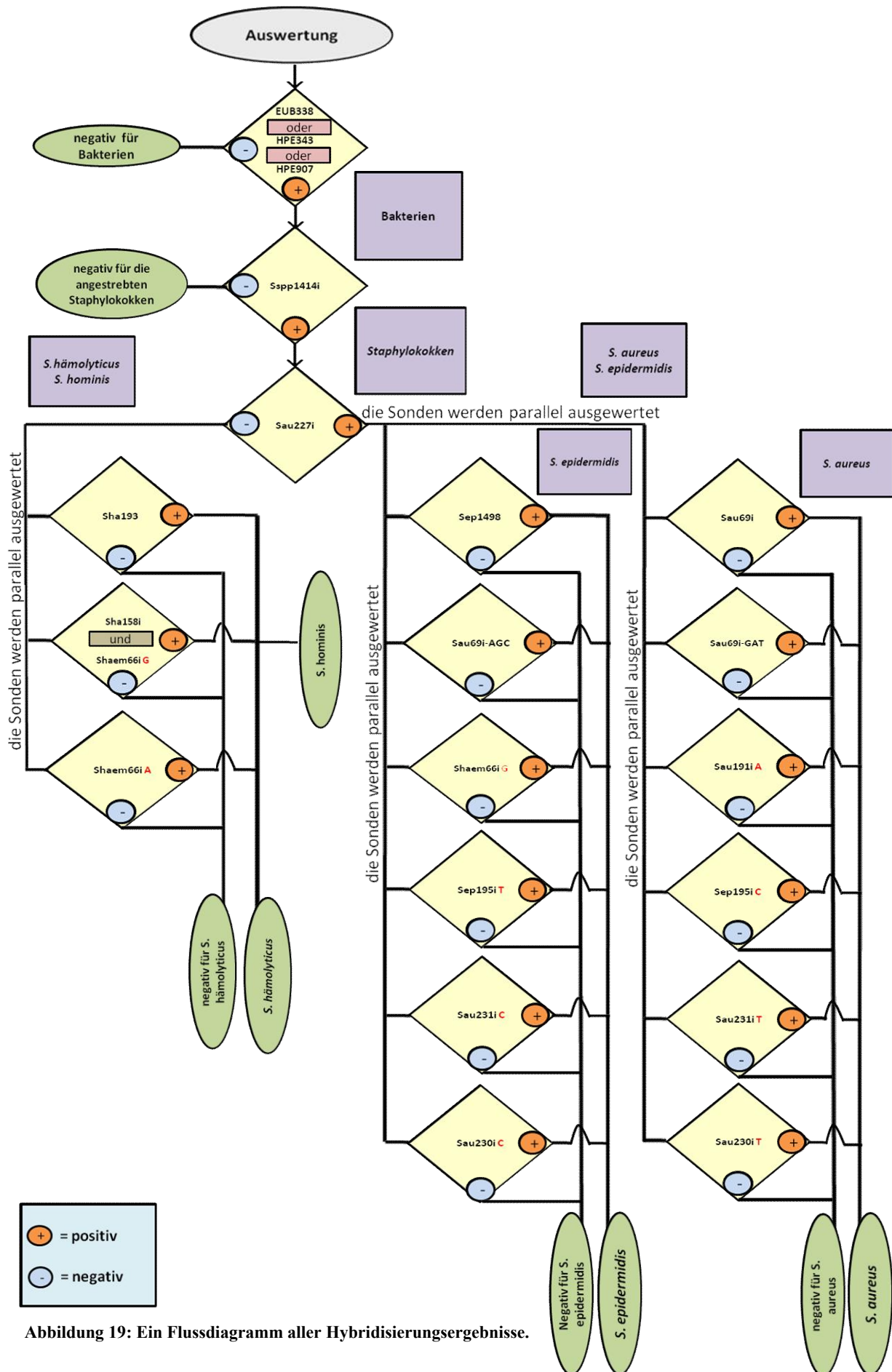


Abbildung 19: Ein Flussdiagramm aller Hybridisierungsergebnisse.

Die Sonden Sau69_AGC und Shaem66i_G zeigten ein positives Signal für *S. epidermidis*-, *S. hominis*-, *S. simulans*- und *S. capitis*-Stämme und negatives Signal für *S. aureus*-Stämme, so dass sie *S. aureus* von *S. epidermidis* unterscheiden konnten. Es ist noch zu sehen, dass die Sonden Sau69-AGC und Shaem66i_G allein nicht ausreichen, um *S. epidermidis* von *S. hominis*-, *S. simulans*- und *S. capitis*-Stämmen zu verifizieren. Des Weiteren zeigte die Sonde Sau230i_C nicht nur für die *S. epidermidis*-Stämme, sondern auch für die *S. haemolyticus*- und die anderen Referenzstämme starke positive Sondensignale. Die Sonde Sau231i_C reagierte dazu positiv auf *S. epidermidis*- und drei *S. capitis*-Stämme und zeigte immer das niedrigste Signal im Vergleich zu den anderen *S. epidermidis* spezifische Sonden. Es kann davon ausgegangen werden, dass entweder die Sonde Sep195i_T oder die Sonde Sep1498 allein zum Nachweis von *S. epidermidis*-Stämmen ausreichen können.

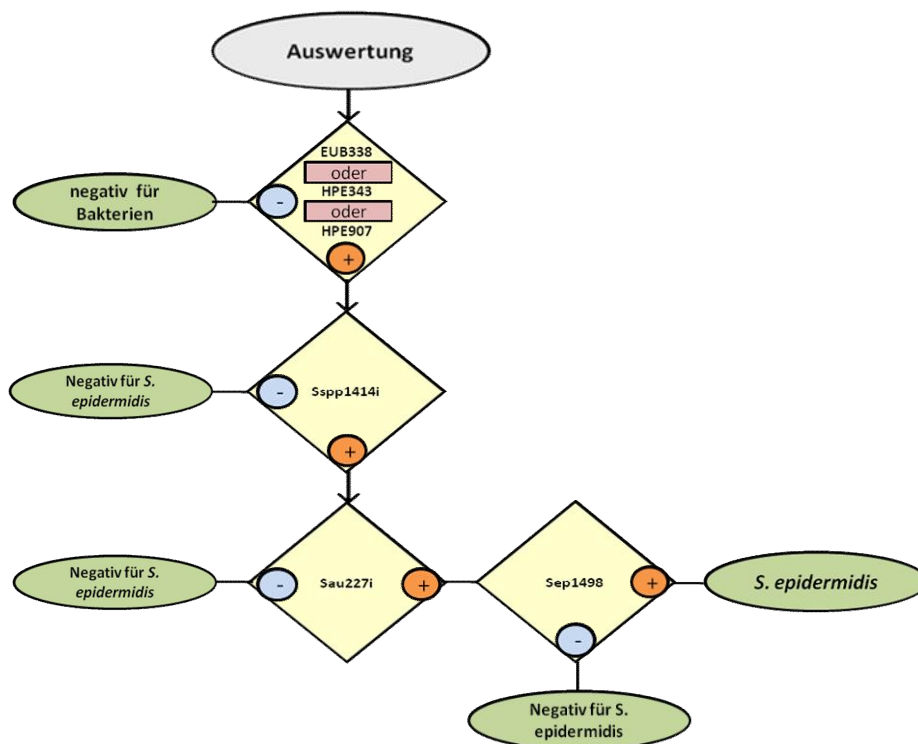


Abbildung 20: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Sep1498 allein bei der Identifizierung von *S. epidermidis*-Stämmen dar.

Wenn in anderen Fällen *S. epidermidis* spezifische Sonden negativ sind, dann setzt die Auswertung gleichzeitig in Richtung der *S. aureus* spezifische SNP-Sonde Sau69i und Sau69i-GAT fort. Anschließend werden auch die *S. aureus* Nicht-SNP-Sonde Sau191_A, Sep195i_C, Sau230i_T und Sau231i_T ausgewertet, wobei hier die SNP-Sonden Sep195i_C, Sau230i_T die besten Signale für *S. aureus*-Stämme zeigten. Von daher könnten diese beiden Sonden

allein zur Detektion von den *S. aureus*-Stämmen führen. Es ist noch zu sagen, dass alle genutzten *S. aureus*-spezifische Sonden im Rahmen dieser Arbeit gut für den Nachweis von *S. aureus*-Stämme funktionierten, mit Ausnahme von Sep1472. Da die Signale dieser Sonde als nicht auswertbar bezeichnet wurden, ist sie in diesem Flussdiagramm nicht enthalten.

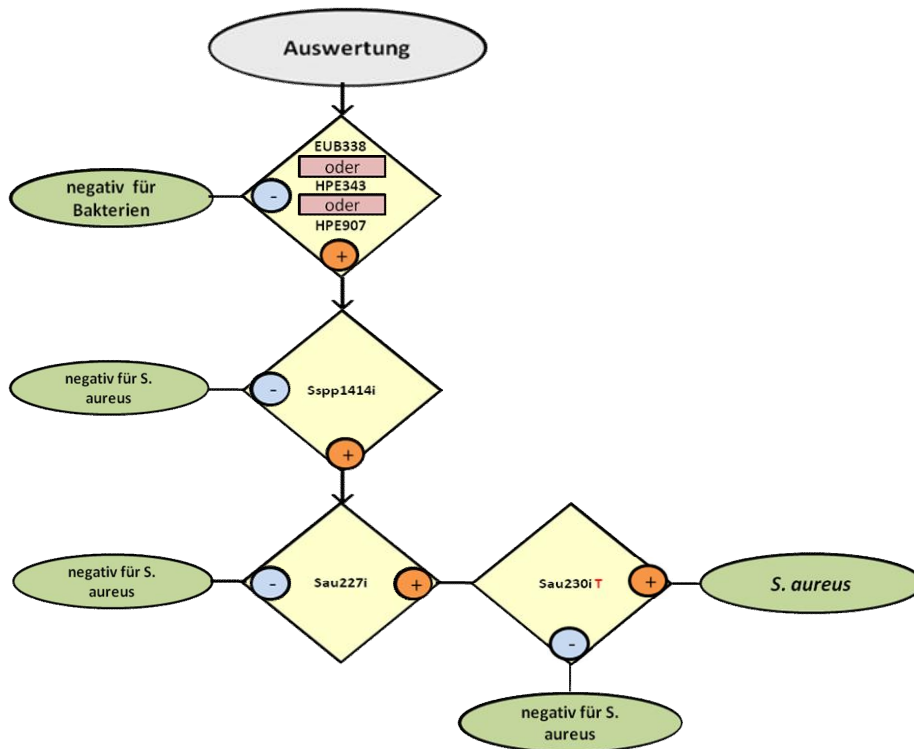


Abbildung 21: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Sau230i_T allein bei der Identifizierung von *S. aureus*-Stämmen dar.

Es ist noch zu beachten, dass die Sondensequenzen des SNP-Sondensatzes Sep195i die erhöhten Signale sowohl mit den *S. epidermidis*-Stämmen als auch mit den *S. aureus*-Stämmen geliefert haben. Somit kann diesen Sondensatz selbst verwendet werden, um die *S. aureus*-Stämme von den *S. epidermidis*-Stämmen zu unterscheiden.

Im folgenden Flussdiagramm (Abbildung 22) wurden die Sonden des Sondensatzes Sep195i parallel ausgewertet, während der *S. aureus*-Stämme mit der Sonde Sep195i_C ein *perfect match*-Signal (PM) zeigten und ergaben die *S. epidermidis*-Stämme mit der Sonde Sep195i_T starke positive *perfect match* Sondensignale.

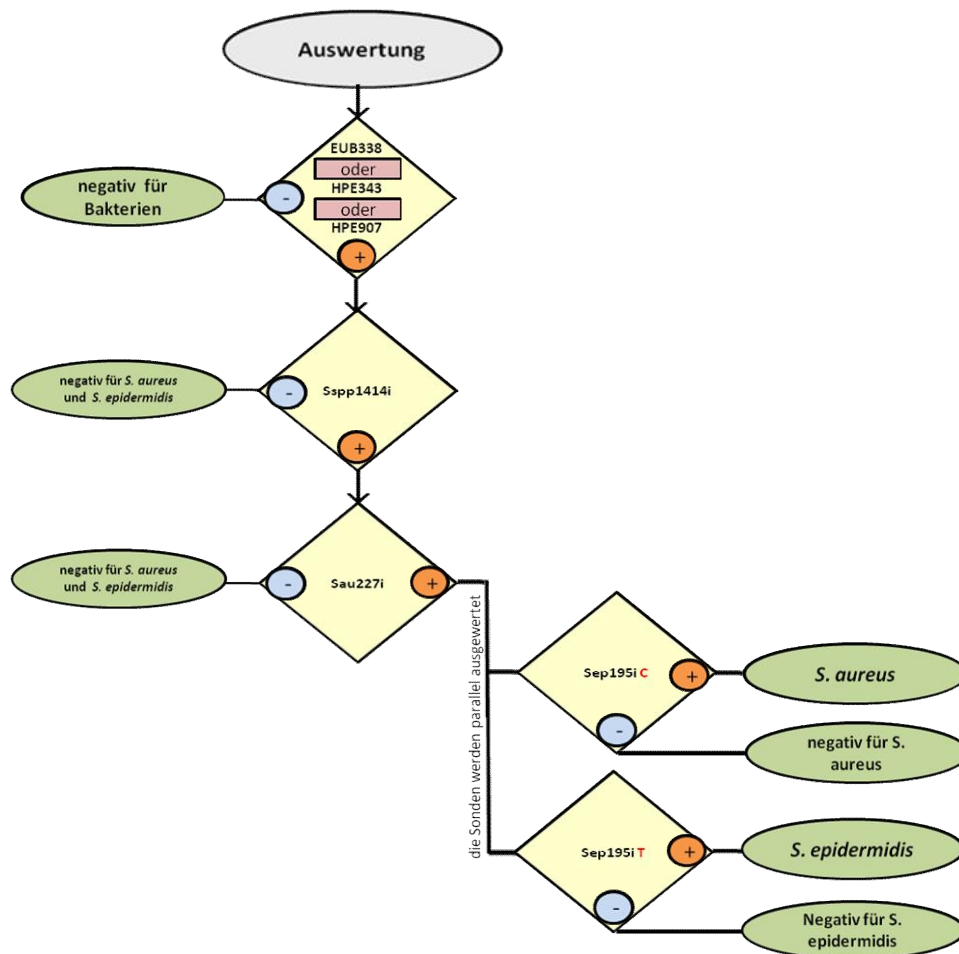


Abbildung 22: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung des Sondensatzes Sep195i bei der Identifizierung von *S. aureus*-, *S. epidermidis*-Stämmen dar. Hier war die PM Sep195i_C für *S. aureus*-Stämme vorherrschend und die PM Sep195i_T gab für *S. epidermidis*-Stämme den starken Signalen.

Wenn die Sonde Sau227i am Anfang des Flussdiagramms negativ ist, setzt der Auswertung in Richtung der *S. haemolyticus* spezifische Sonde Sha185i fort, die positive Signale für *S. haemolyticus*-, *S. hominis*-, *S. auricularis*-, *S. warneri*- Stämme und negative Signale für *S. aureus* und *S. epidermidis*-Stämme aufwies. Durch das testen von der Sonde Sha185i im SILVA Probe Match und Evaluation Tool wurde festgestellt, dass ein miss match ausreichend ist, damit *S. hominis*-Stämme mit dieser Sonde auch detektiert werden können. Darüber hinaus zeigte die nächste *S. haemolyticus* spezifische Sonde Sha195i auch positive Signale für *S. haemolyticus*-, *S. hominis*- und *S. auricularis*-Stämme und weitere drei Referenzstämme. Bis hier konnten *S. hominis*-Stämme von *S. haemolyticus*-, *S. epidermidis*- und *S. capitis*-Stämmen nur dann unterschieden werden, wenn die Sonden Sha185i und Shaem66i_G gleichzeitig positiv waren. Aus diesem Grund spielt die SNP-Sonde Shaem66i_A für den Nachweis von *S. haemolyticus*-Stämme eine wichtige Rolle, da sie *S. haemolyticus*-Stämme

von den *S. aureus* und *S. epidermidis*-Stämmen sowie von anderen Referenzstämmen unterscheiden kann. Demzufolge könnte sie allein für den Nachweis von *S. haemolyticus*-Stämmen ausreichend sein, wenn sie positiv ausfällt.

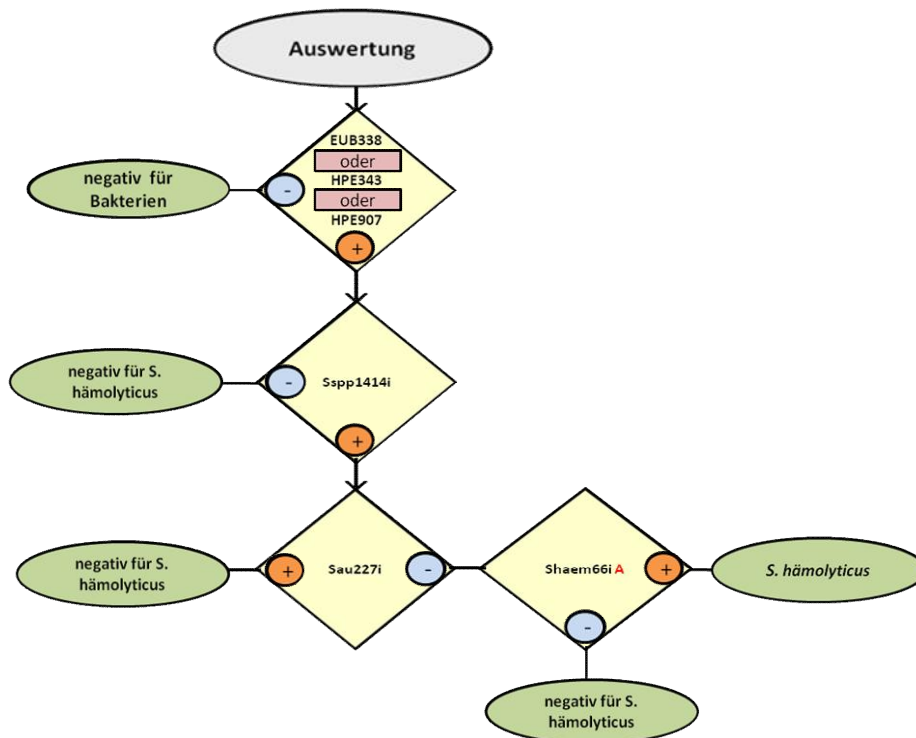


Abbildung 23: Ein Flussdiagramm stellt die Verwendung der Sonde Shaem66i_A allein bei der Identifizierung von *S. haemolyticus*-Stämmen dar.

5. Fazit und Ausblick

Abschließend ist zu sagen, dass die Amplifikation allen drei gezielten Genfragmenten (23S-rDNA-, 16S-rDNA- und *mecA*-Gen) in einer Multiplex-Markierung-PCR für *S. aureus*-, *S. lugdunensis*-, *S. saprophyticus*-, *S. pseudintermedius*-Stämme, *S. equorum* und *S. xylosus* erfolgreich stattfand. Ebenfalls wurde die Amplifikation der zwei Gene (16S-rDNA- und *mecA*-Gen) in einer Duplex-Markierung-PCR für *S. epidermidis*-, *S. haemolyticus*-, *S. hominis*-, *S. simulans*-, *S. capitis*-, *S. cohnii*-, *S. warneri*- und *S. Auricularis*-Stämme immer erfolgreich durchgeführt, bei denen es daher notwendig war, eine zusätzliche Monoplex-PCR für das dritte Gen (23S-rDNA) durchzuführen. Das optimierte Multiplex-PCR-Protokoll im Rahmen dieser Arbeit könnte in späteren neuen Experimenten mehr angepasst werden, um die Amplifikation der drei gezielten Gene gleichzeitig und in ausreichender Konzentration zu erreichen, ohne dabei eine zusätzliche Monoplex-PCR für das 23S-rDNA-Genfragment bei allen Stämmen durchzuführen. Somit könnte der Gesamtaufwand, die Zeit und die Kosten gesenkt werden.

In Anschluss konnte durch die Hybridisierung der Ziel-DNA der 166 getesteten Stämme vom RKI auf DNA-Microarray zweifelsfrei *S. aureus* von *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* sowie von anderen Stämmen unterschieden werden. Darüber hinaus konnten die Resistenz und das Vorhandensein vom *mecA*-Gen in 161 Stämmen zweifelsfrei identifiziert werden. Außerdem konnte festgestellt werden, ob es sich um das *mecA*-Gen um SCCmec-Typ *mecA_I-X* oder *mecA_XI* handelt. Es wird weiterhin empfohlen, dass es bei zukünftigen Experimenten sinnvoll wäre, einigen minderwertigen Sonden durch andere mehr aussagekräftige Sonden zu ersetzen. Zu untergeordneten Sonden zählen die Sonden, die immer nicht auswertbar waren oder eine verringerte Ausbeute ergaben. Beispielweise könnten die Sonden Sep1472, Shaem66i für *S. aureus*, Sau191i und Sau230i für *S. epidermidis* und Sha185i für *S. haemolyticus* in Betracht gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) RKI. *Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*. Von RKI-Ratgeber für Ärzte, 2016. Mai. Epidemiologisches Bulletin 08/2000.
[www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.htm](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html)
l.
- (2) Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. (1997). *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clinical Microbiology Reviews, 10(3), 505–520.
- (3) George Y. Liu (2009). *Molecular Pathogenesis of Staphylococcus aureus Infection*. Pediatric Research, 65(5 Pt 2), 71R–77R. <http://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819dc44d>.
- (4) Justyna Bien, Olga Sokolova, and Przemyslaw Bozko, *Characterization of Virulence Factors of Staphylococcus aureus: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response*. Journal of Pathogens Volume 2011 (2011), Article ID 601905, 13 pages <http://dx.doi.org/10.4061/2011/601905>.
- (5) Bidya Shrestha, Winny Singh, V. Samuel Raj, Bharat Mani Pokhrel, and Tribhuban Mohan Mohapatra (18 June 2014). *High Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes in Nosocomial-Acquired Staphylococcus aureus Isolated from Tertiary Care Hospitals in Nepal*. India: BioMed Research International Volume 2014 (2014), Article ID 790350, 7 pages.
- (6) Ruud H. Deurenberg, Ellen E Stobberingh. 2009 Mar. *The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med. 9 (2): 100–115.
- (7) Tara C. Smith. (2015). *Livestock-Associated Staphylococcus aureus*. The United States Experience. PLoS Pathogens, 11(2), e1004564. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004564>.
- (8) Elisabeth Meyer, Christin Schröder, Petra Gastmeier, Christine Geffers. Dtsch Arztebl 2014; 111(19). *The reduction of nosocomial MRSA infection in Germany—an analysis of data from the Hospital Infection Surveillance System (KISS) between 2007 and 2012*. Meyer, Elisabeth; Schröder, Christin; Gastmeier, Petra; Geffers, Christine.

- (9) Lowy, Franklin D. (2003.May.01). *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Investigation, 111(9), 1265–1273. <http://doi.org/10.1172/JCI200318535>.
- (10) Teruyo Ito. (2009). *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) Corresponding*. Juntendo University, Department of Bacteriology, Hongo 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan. Phone: 81-3-5802-1041. Fax: 81-3-5684-7830. E-mail: teruybac@juntendo.ac.jp. : Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(12), 4961–4967. <http://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>.
- (11) Britta Ballhausen, André Kriegeskorte, Nina Schleimer, Georg Peters, and Karsten Becker. (2014 Jul). *The mecA Homolog mecC Confers Resistance against β -Lactams in Staphylococcus aureus Irrespective of the Genetic Strain Background*. Antimicrob Agents Chemother. 58(7): 3791–3798. doi: 10.1128/AAC.02731-13.
- (12) Pedro Arêde, Joana Ministro, und Duarte C. Oliveira. (2012). *The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the mecA Repressor and Enables Optimal Expression of β -lactam Resistance in MRSA*. PLoS Pathogens, 8(7), e1002816. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002816>.
- (13) Ruscher, Claudia. RKI. *Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen,* “Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz, vol. 57, no. 6, pp. 695–732, 2014.
- (14) G. Geldner, M. Zwing, M. Trautmann, M. Georgieff, H. Wiedeck. (1999.April.16). *Therapie und Prophylaxe bei MRSA-Infektionen auf Intensivstationen*. Intensivmed (1999) 36: 612. doi:10.1007/s003900050352.
- (15) Stürenburg, Enno. (2009). *Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations*. GMS German Medical Science, 7, Doc06. <http://doi.org/10.3205/000065>.
- (16) Miriam Ender, Brigitte Berger-Bächi und Nadine McCallum. *Variability in SCCmec NI spreading among injection drug users in Zurich*. Switzerland: BMC Microbiologie 2007,7:62.

- (17) Jason E. Farley, Paul D. Stamper, Tracy Ross, Mian Cai, Sharon Speser, Karen C. Carroll. *Comparison of the BD GeneOhm Methicillin-resistant Staphylococcus aureus PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from at-risk community population.* J Clin Microbiol. 2008, 46: 743-746 .
- (18) Diane Flayhart, Janet F. Hindler, David A. Bruckner, Geraldine Hall, Rabin K. Shrestha, Sherilynn A. Vogel, Sandra S. Richter, Wanita Howard, Rhonda Walther, und Karen C. Carroll. *Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA Medium for direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from surveillance cultures of the anterior nares.* J Clin Microbiol. 2005, 43: 5536-5540 .
- (19) Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E.. *Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant Staphylococcus screening, surveillance and typing.* state of the art and unmet needs; CMI 2009.
- (20) BDSI. *Die Polymerasekettenreaktion (PCR).* SÜSSWAREN (2008) Heft 10/ lci-koeln@lci-koeln.de.
- (21) Elfath M. Elnifro, Ahmed M. Ashshi, Robert J. Cooper, und Paul E. Klapper. (2000). *Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology.* Clinical Microbiology Reviews, 13(4), 559–570.
- (22) Biosciences. (2002). *Microarray handbook.* 800 Centennial Avenue. Po Box 1327 Piscataway, NJ 08855 USA: Amersham Biosciences Corp 63-0048049 Rev. A, 2002-02-455/105.
- (23) W. Ludwig, O. S. B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.-H. Schleifer “ARB: a software environment for sequence data.” . Nucleic Acids Res., vol. 32, no. 4, pp. 1363–71, Jan. 2004..
- (24) Letowski J, Brousseau R, Masson L. “*Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays.*” . J. Microbiol. Methods, vol. 57, no. 2, pp. 269–78, May 2004.

- (25) Qiagen. “*HotStarTaq PCR Handbook - manual_polymerase.pdf*.”. [Online]. Available: http://www.hainlifescience.de/uploadfiles/file/downloadcenter/polymerase/manual_polymerase.pdf. [Accessed: 24-Oct-2015].
- (26) O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance und P.H. Vogt. *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*. Indiana University, Indianapolis, IN, USA and University, Heidelberg Germany: *BioTechniques* 23:504-511 (September 1997).
- (27) Harald Peter, Kathrine Berggrav, Peter Thomas, Yvonne Pfeifer, Wolfgang Witte, Kate Templeton und Till T. Bachmann. *Direct Detection and Genotyping of Klebsiella pneumoniae Carbapenemases from Urine by Use of a New DNA Microarray Test*. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec; 50(12): 3990–3998. doi: 10.1128/JCM.00990-12.
- (28) Qiagen. “*HotStartaq PCR Handbook*,” Qiagen, “*HotStartaq PCR Handbook*,”. *Sample Assay Technol.*, no. December 2005, 2008..
- (29) Dyomics. *DY-647PI*. Otto-Schott-Str. 15, 07745 Jena in Deutschland: <http://www.dyomics.com/en/products/red-excitation/dy-647.html>.
- (30) Scanner. *GenePix 4300A / GenePix 4300A*. 1311 Orleans Avenue Sunnyvale, California United States Website: <http://www.moleculardevices.com/>: Molecular Devices LLC.

7. Anhang

Die folgenden Abbildungen stellen die gescannten Bilder und die Diagramme von den ersten neun Hybridisierung-Versuchen dar. Hier werden In den Diagrammen die absoluten Signale der SNP-Sonden und die normalisierten Signale der SNP-Sonden gezeigt. Weiterhin wurden die MM_{\max}/PM -Verhältnisse der Sondensätze, die Standardabweichung und die absoluten Signale der Kontrollsonden und der Nicht-SNP-Sonden dargestellt.

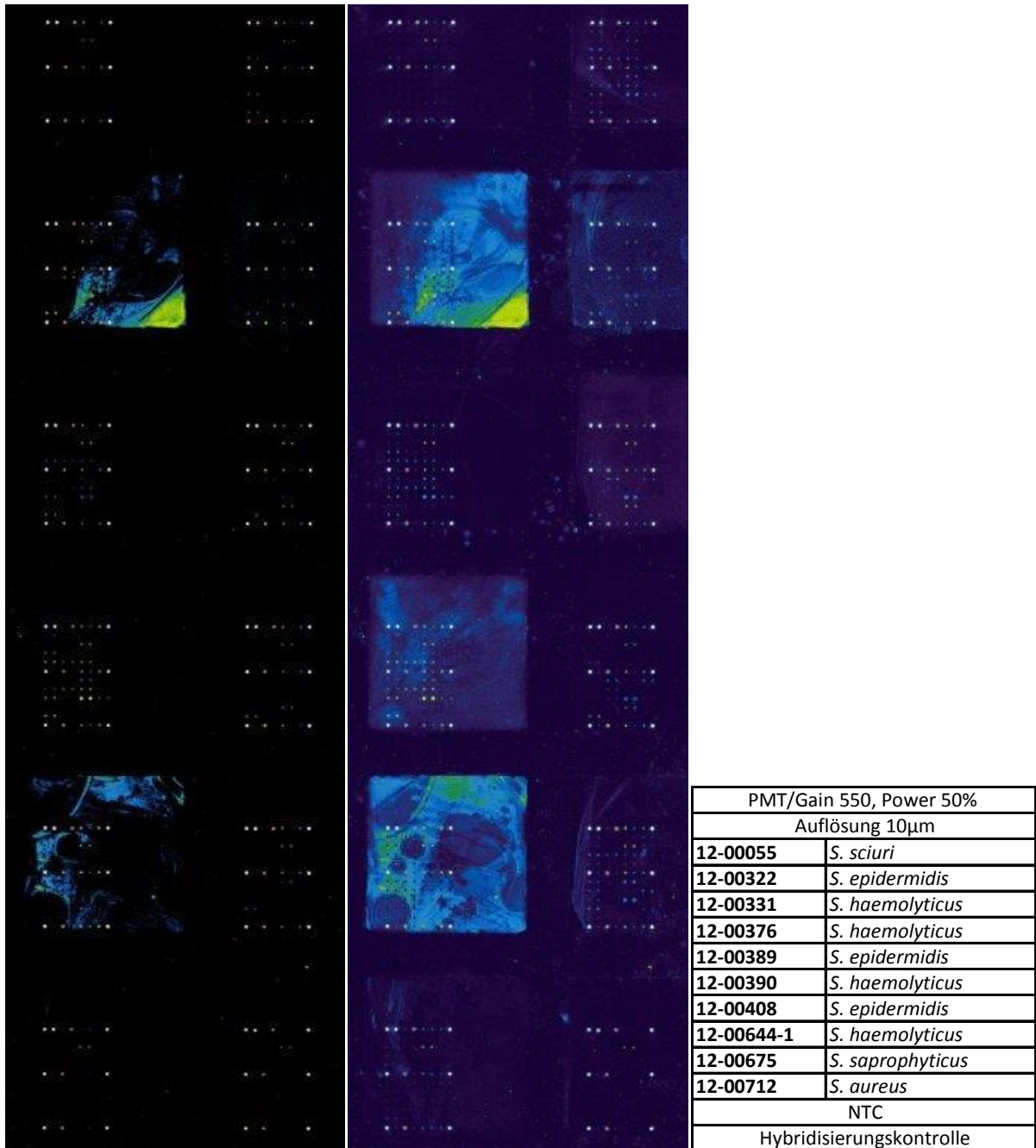


Abbildung 24: DNA-Microarray von Slide 1. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

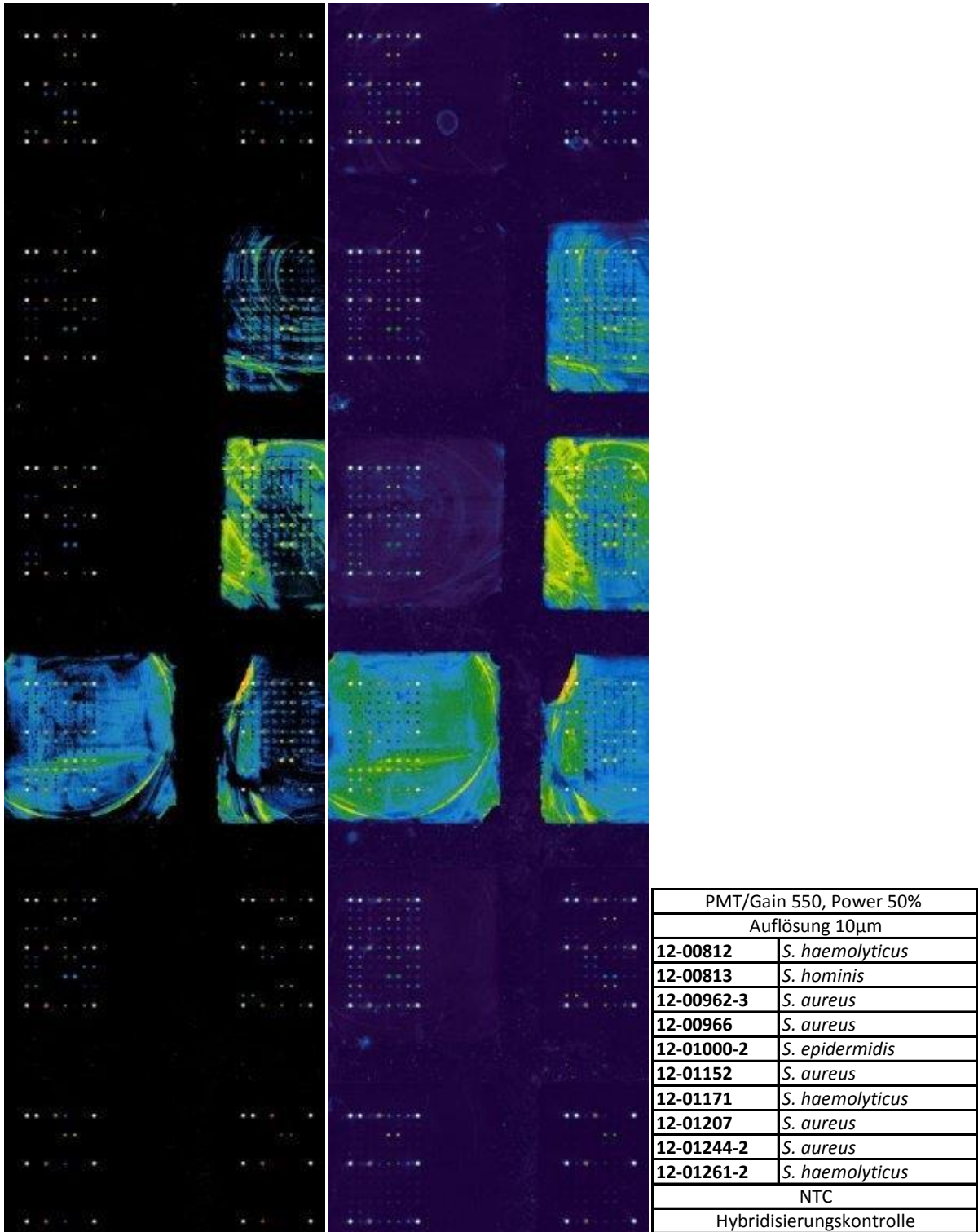
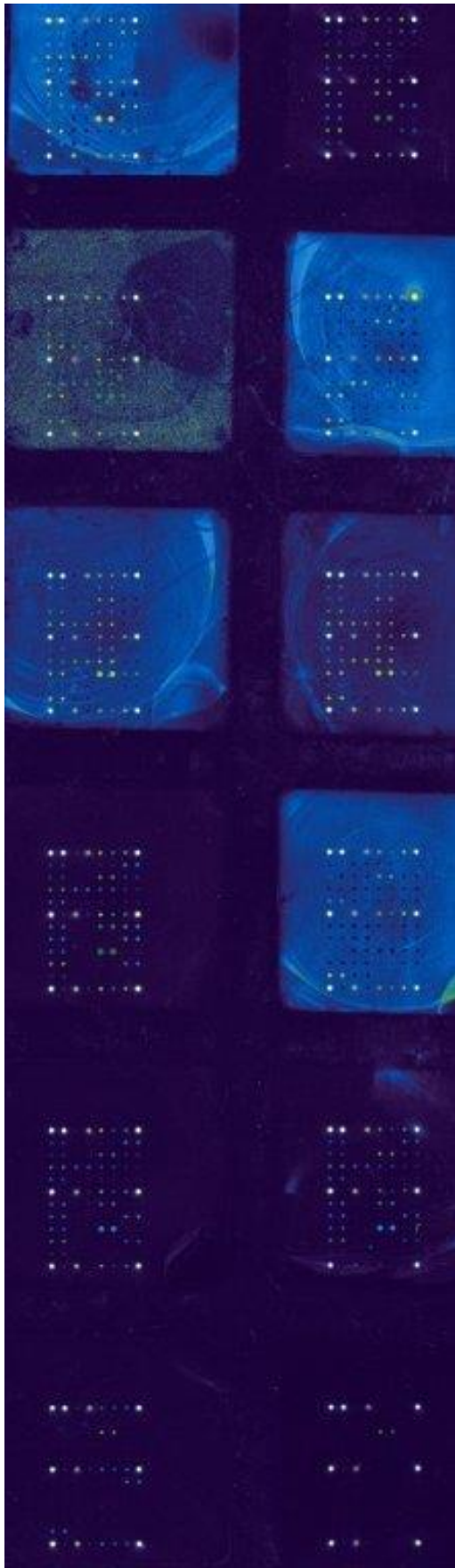


Abbildung 25: DNA-Microarray von Slide 2. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.



PMT/Gain 550, Power 50%	
Auflösung 10µm	
12-01401	<i>S. aureus</i>
12-01476	<i>S. aureus</i>
12-01536	<i>S. epidermidis</i>
12-01608	<i>S. simulans</i>
12-01631	<i>S. epidermidis</i>
12-01795	<i>S. epidermidis</i>
12-01856-1	<i>S. aureus</i>
12-01969	<i>S. sciuri</i>
12-01970	<i>S. aureus</i>
12-02020	<i>S. aureus</i>
NTC	
Hybridisierungskontrolle	

Abbildung 26: DNA-Microarray von Slide 3. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

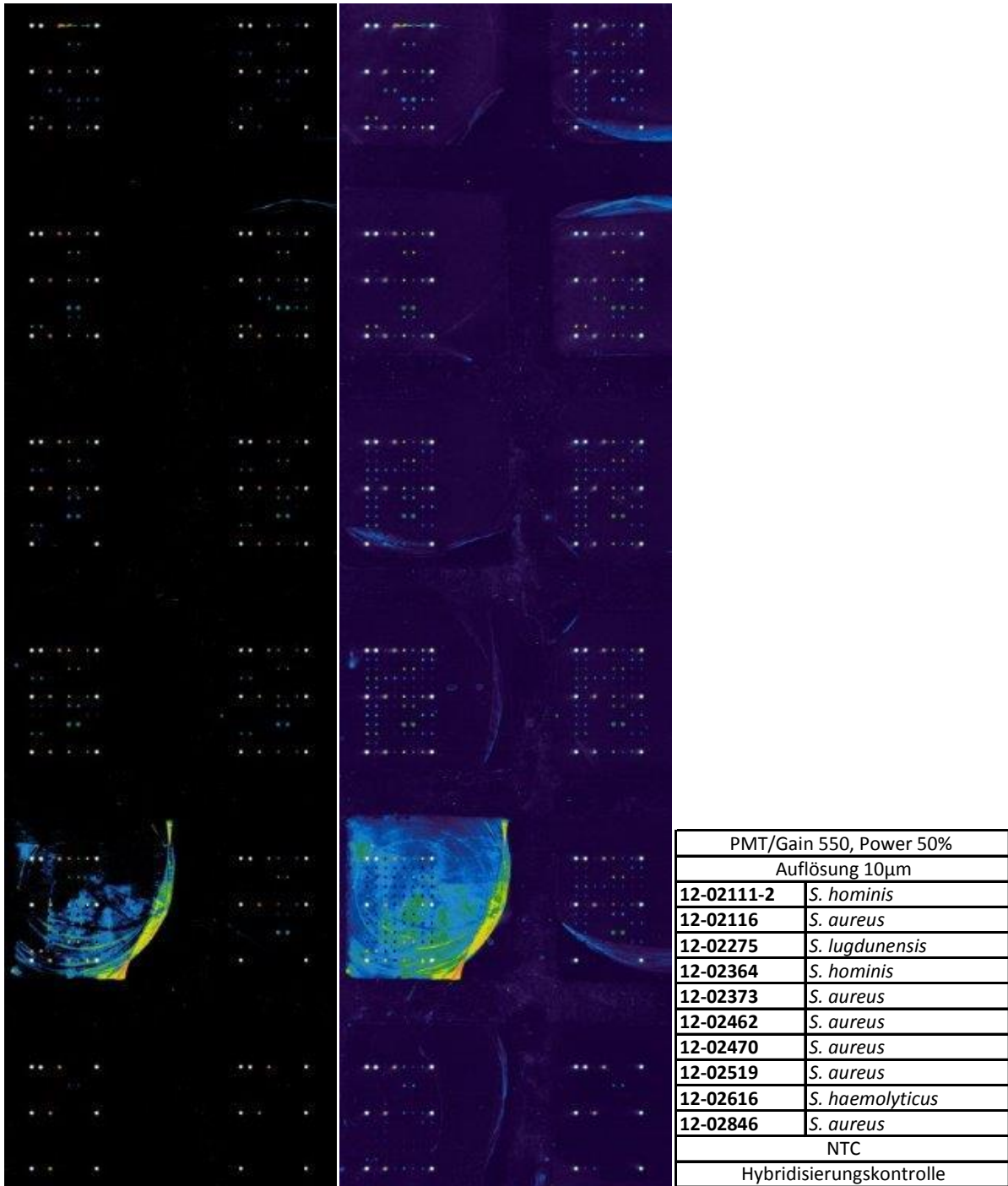


Abbildung 27: DNA-Microarray von Slide 4. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

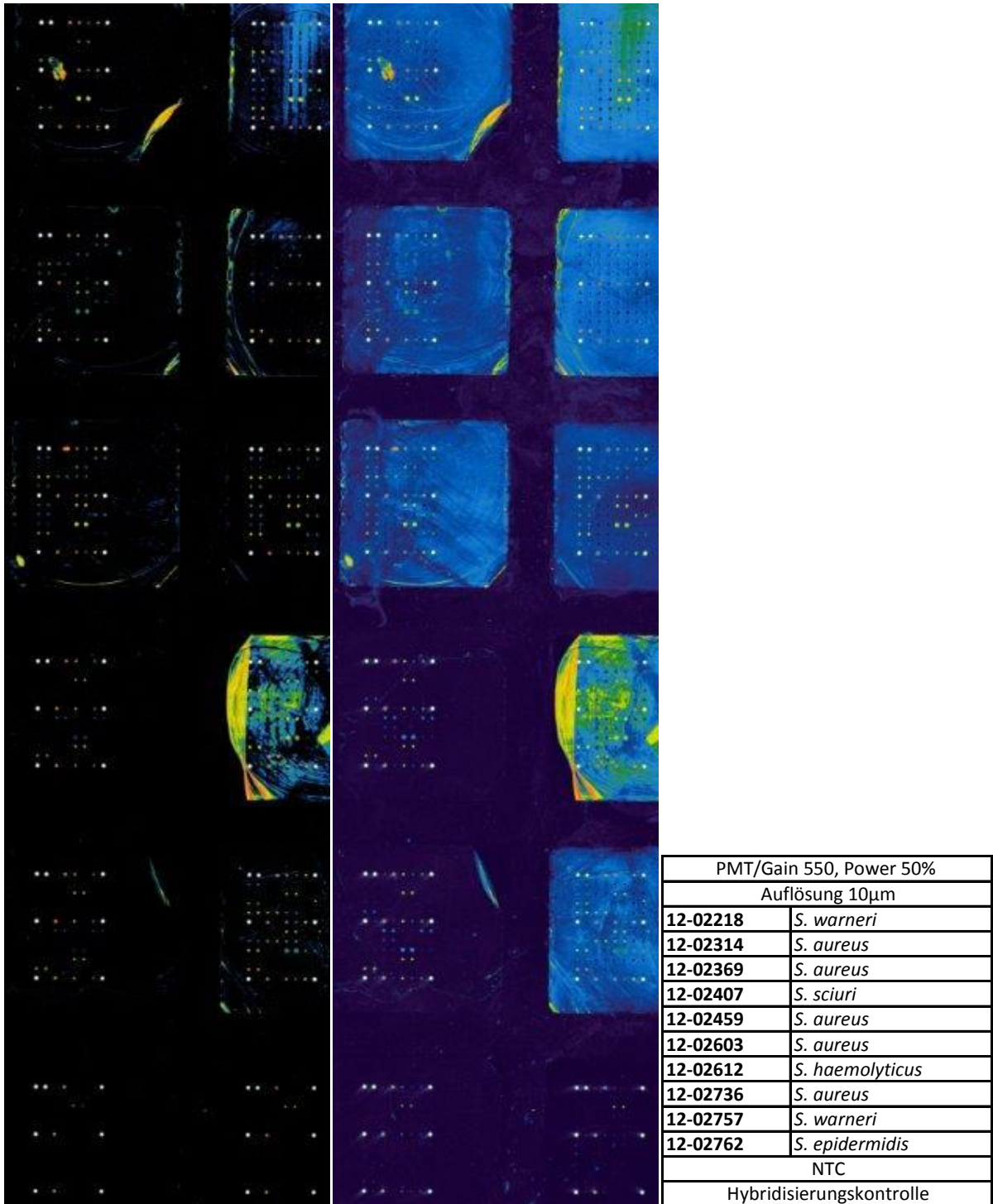


Abbildung 28: DNA-Microarray von Slide 5. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

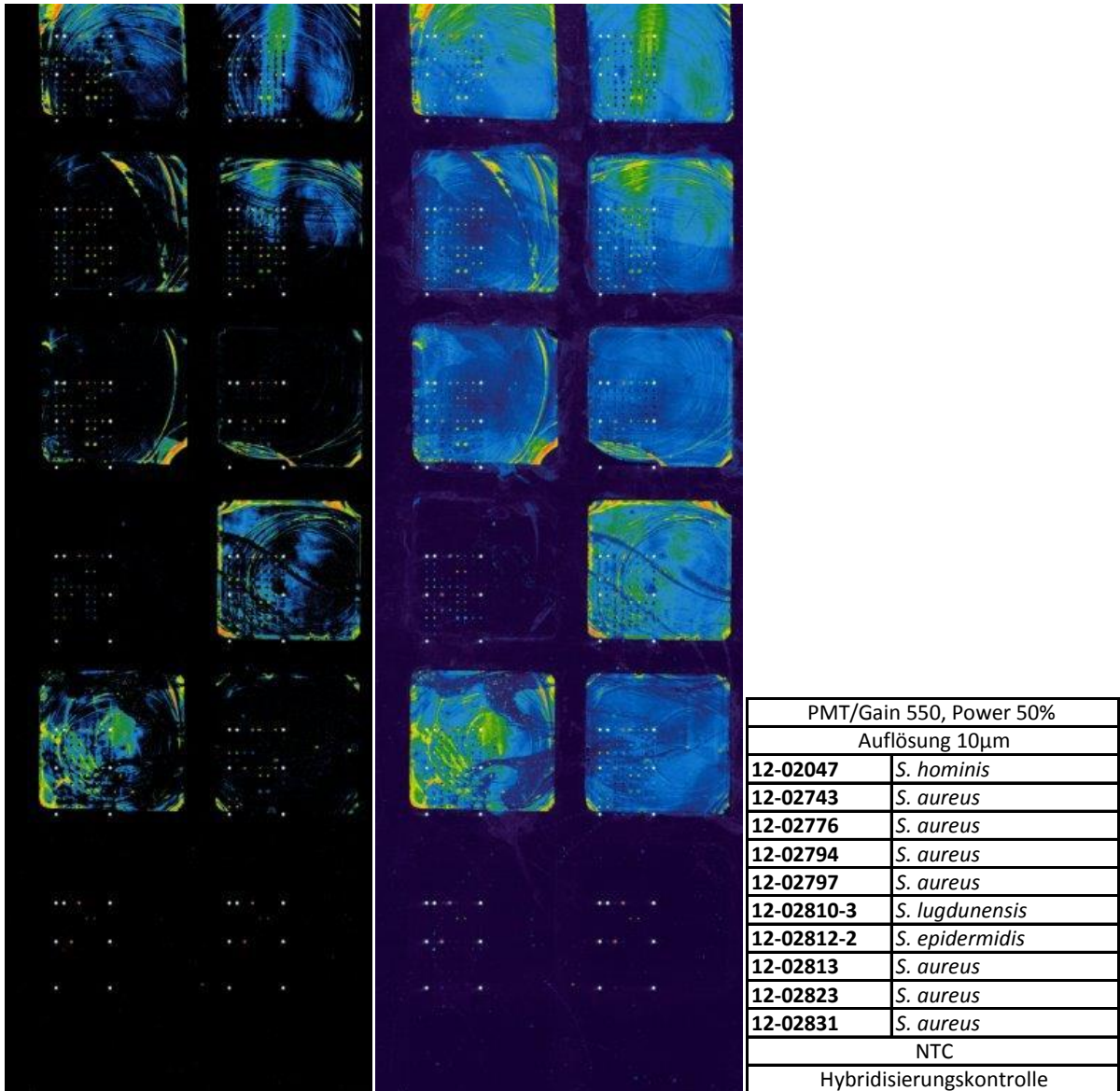


Abbildung 29: DNA-Microarray von Slide 6. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

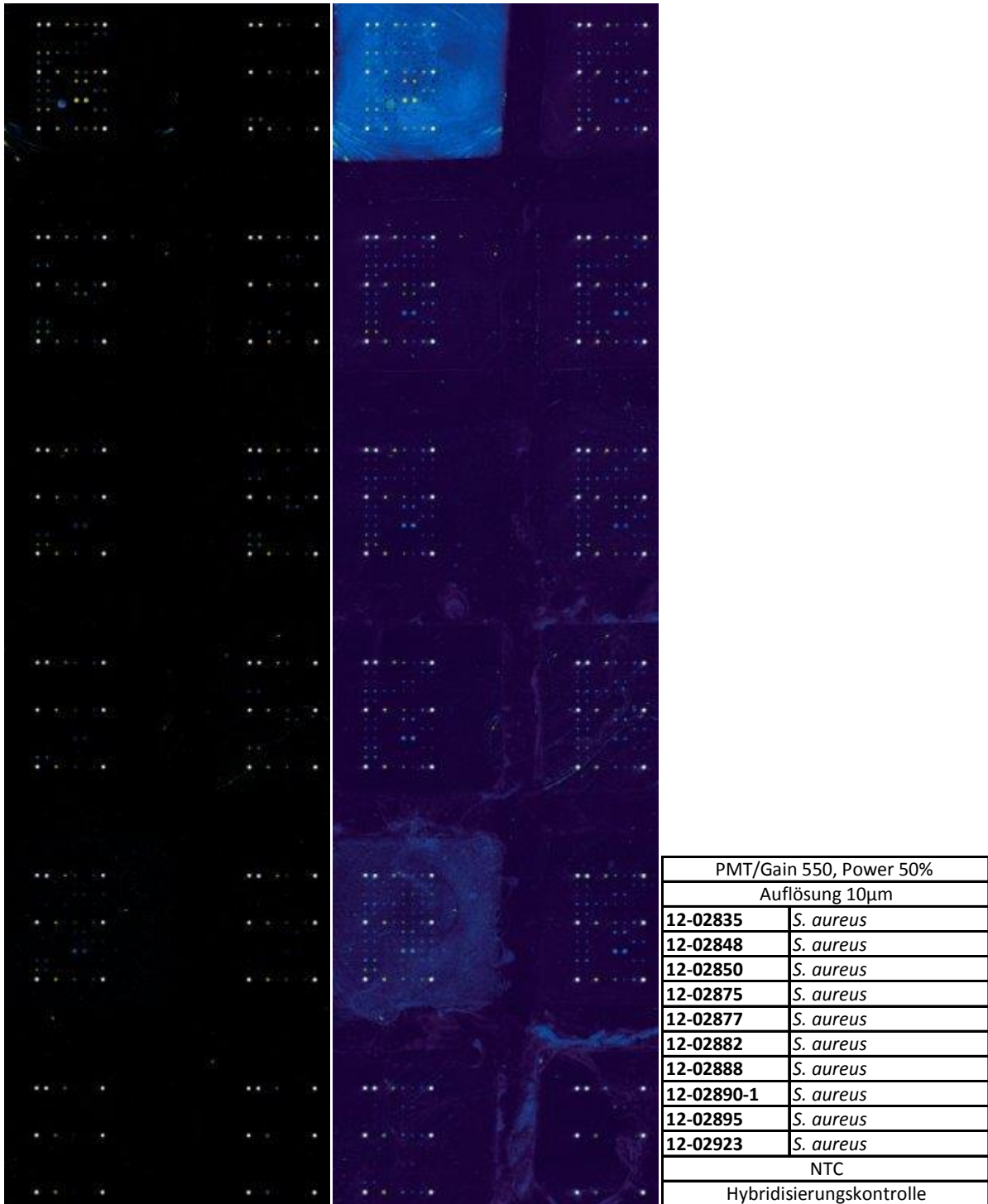


Abbildung 30: DNA-Microarray von Slide 7. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

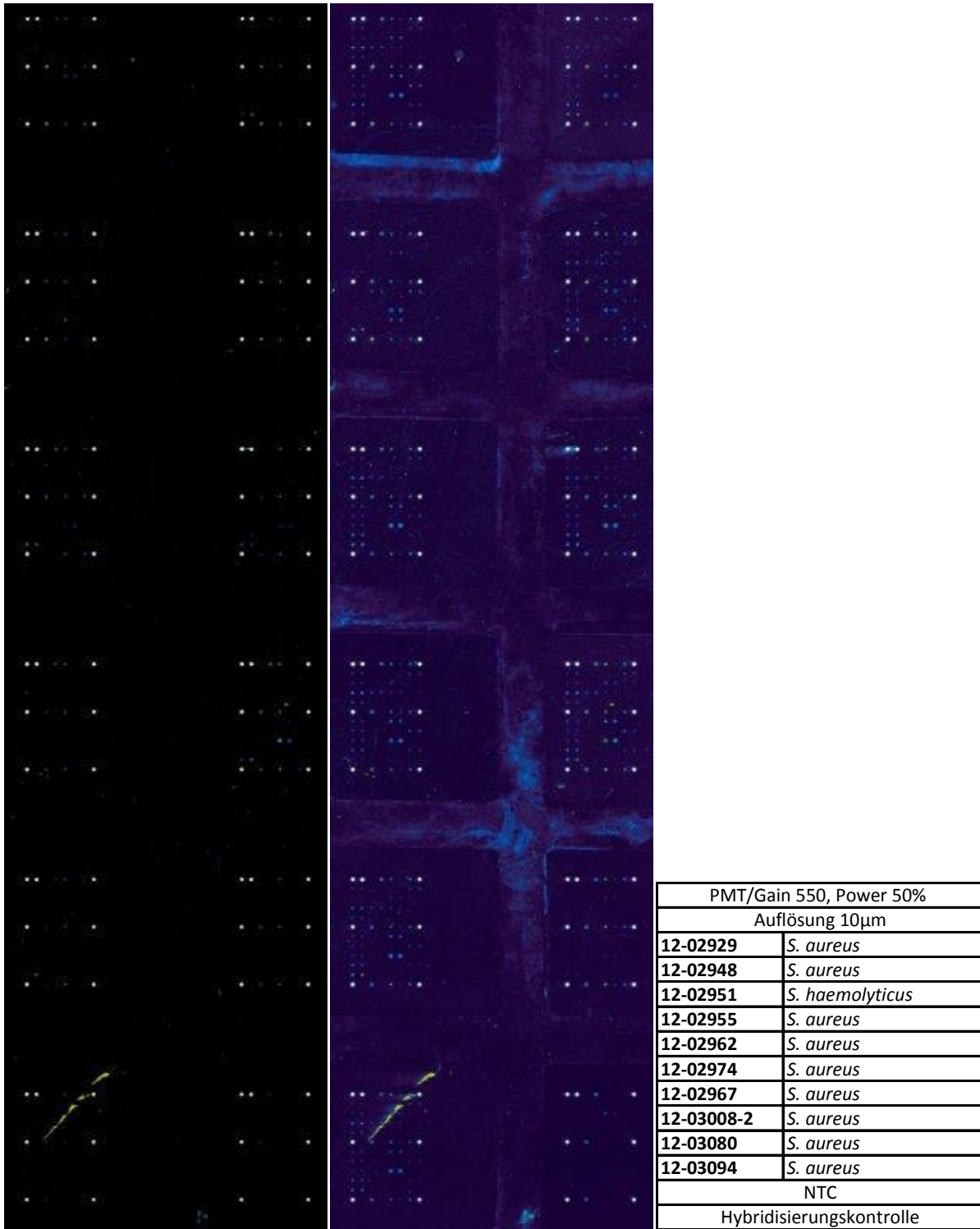


Abbildung 31: DNA-Microarray von Slide 8. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

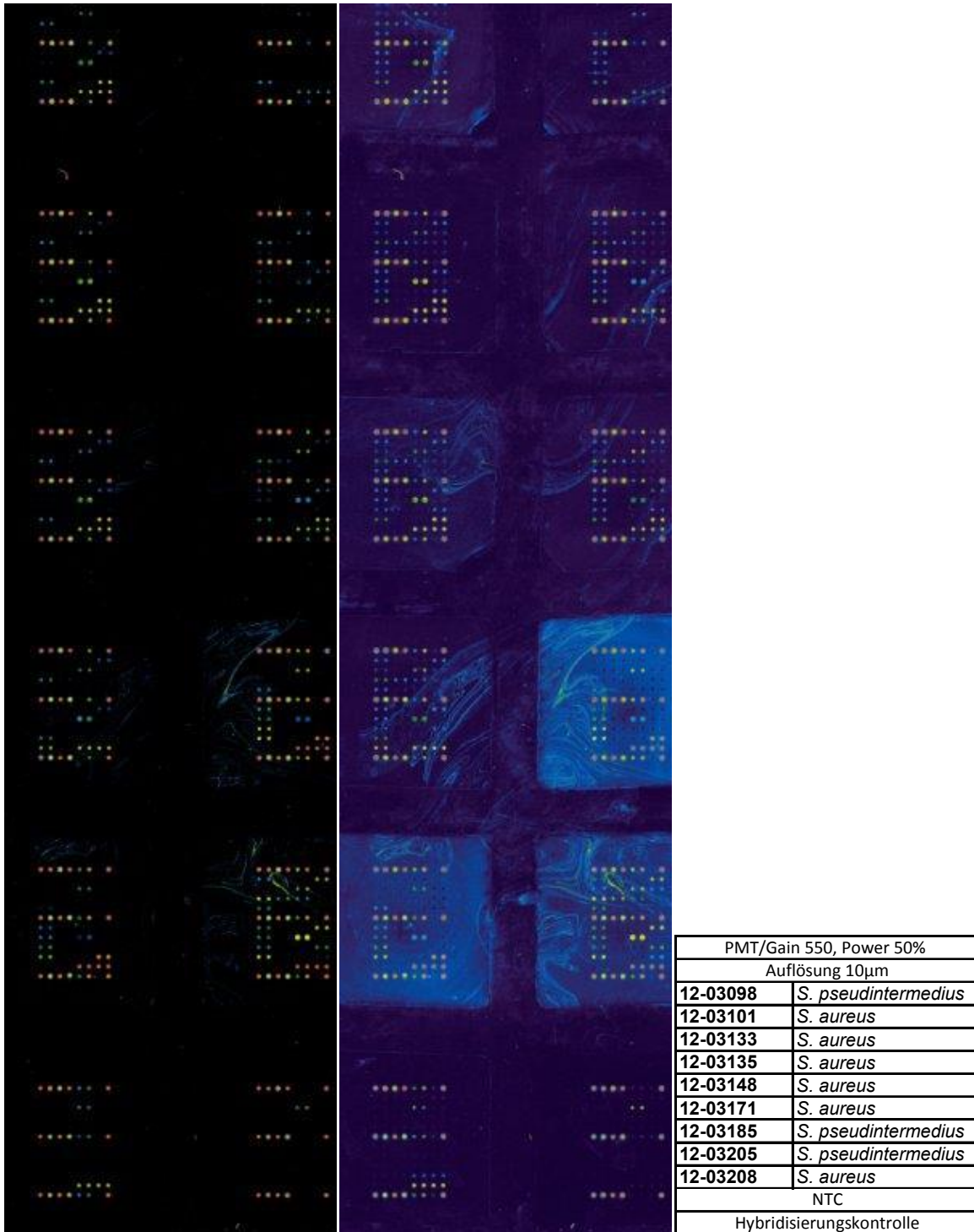


Abbildung 32: DNA-Microarray von Slide 9. Aufgenommen mit Wellenlänge 635nm, PMT/550, Power 50% und Auflösung von 10 µm am GenePix 4300A. In der Tabelle findet sich die Array-Belegung.

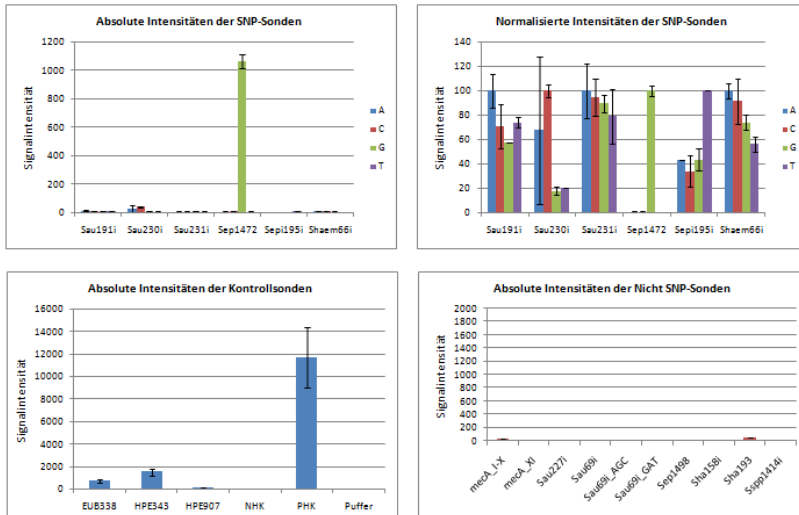


Abbildung 33: Sondensignale vom *S. Sciuri* (12-00055)-Stamm, Slide 1 und Array 1.

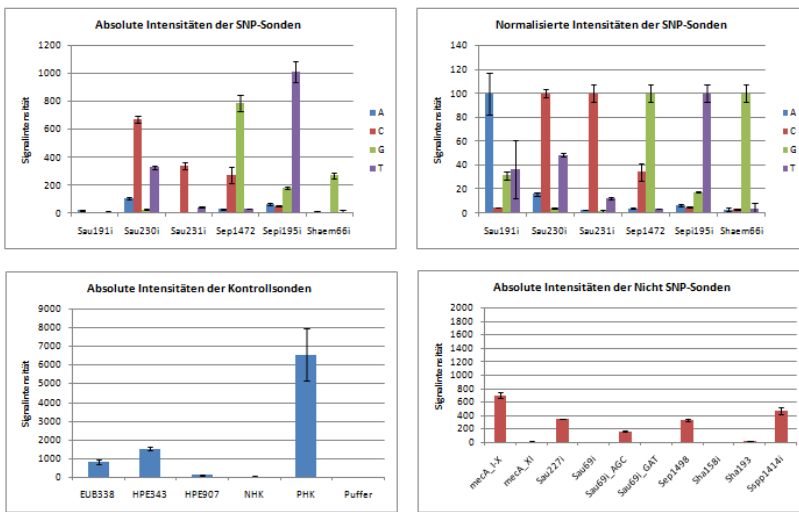


Abbildung 34: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-00322)-Stamm, Slide 1 und Array 2.

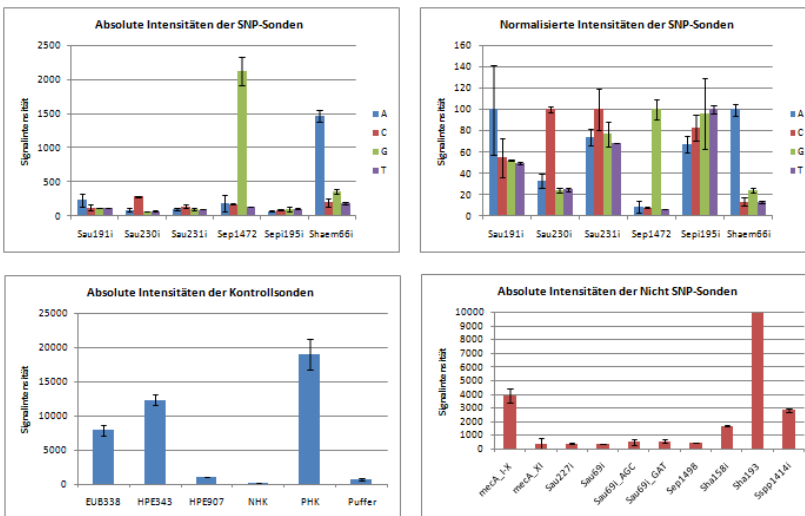


Abbildung 35: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-00331)-Stamm, Slide 1 und Array 3.

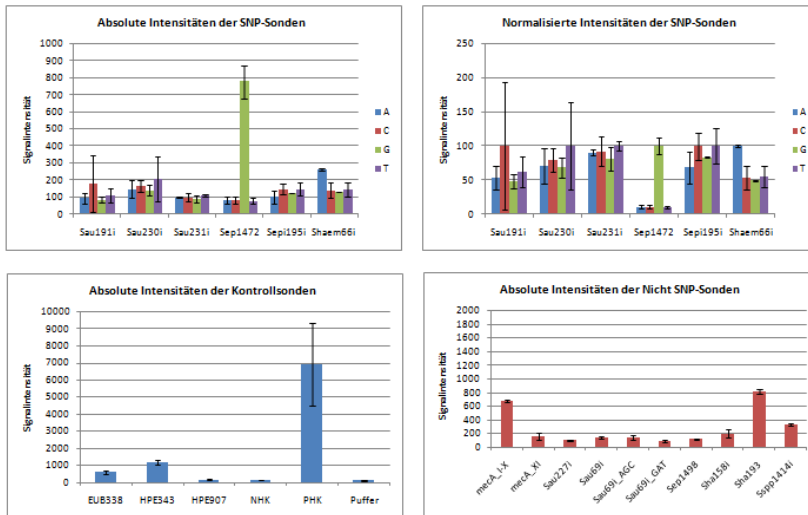


Abbildung 36: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-00376)-Stamm, Slide 1 und Array 4.

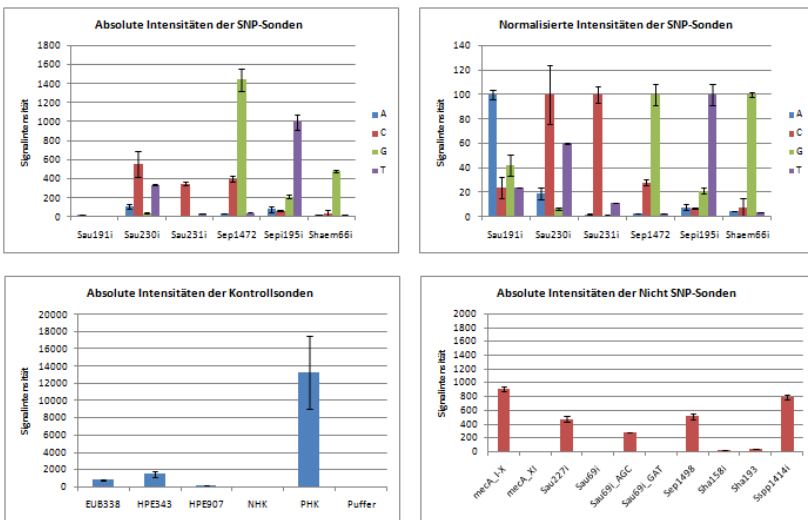


Abbildung 37: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-00389)-Stamm, Slide1 und Array 5.

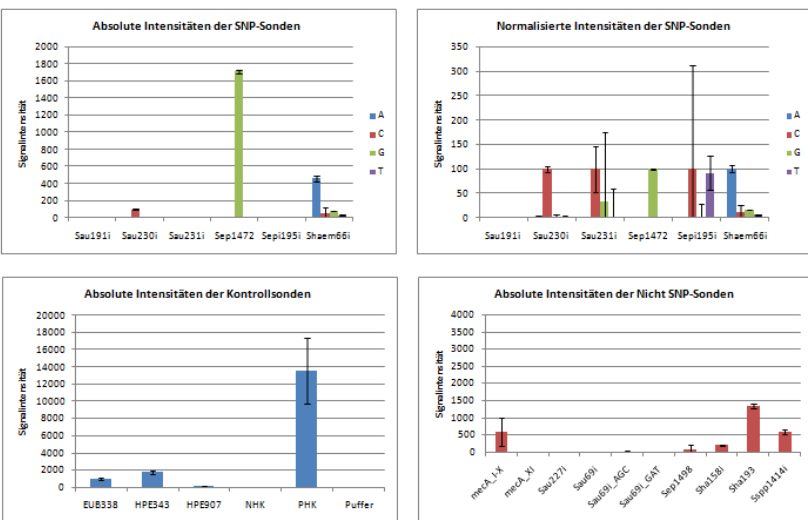


Abbildung 38: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-00390)-Stamm, Slide 1 und Array 6.

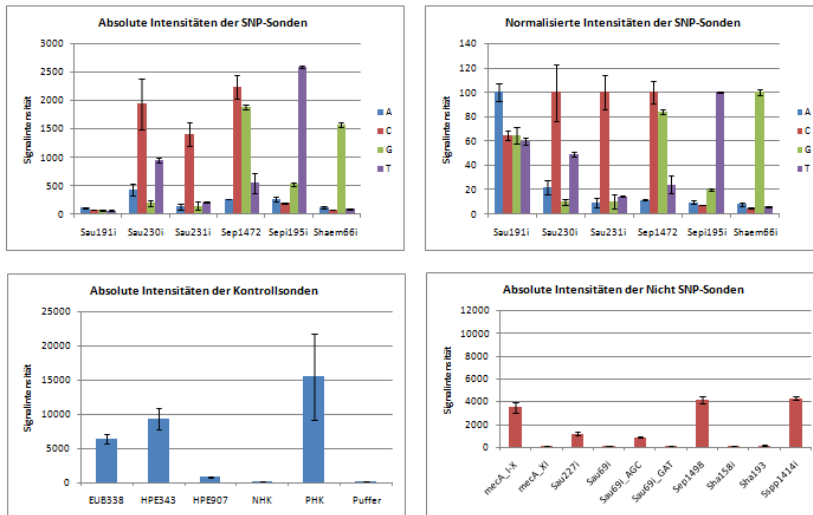


Abbildung 39: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-00408)-Stamm, Slide 1 und Array 7.

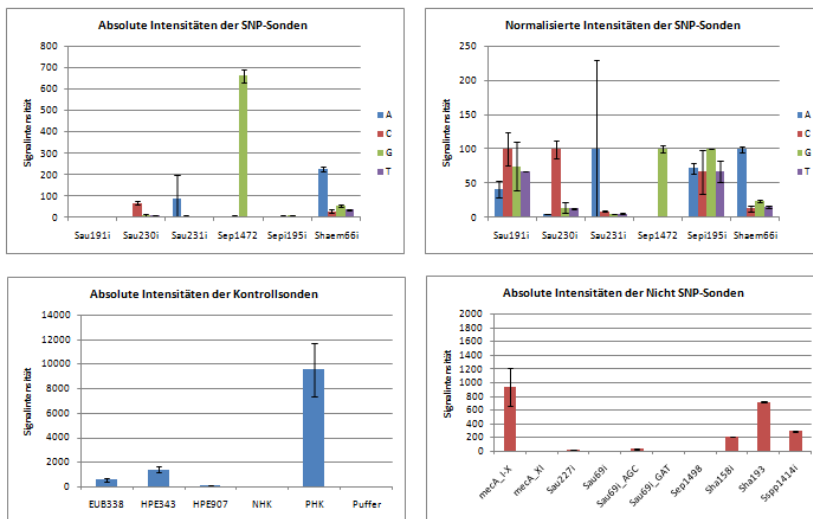


Abbildung 40: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-00644-1)-Stamm, Slide 1 und Array 8.

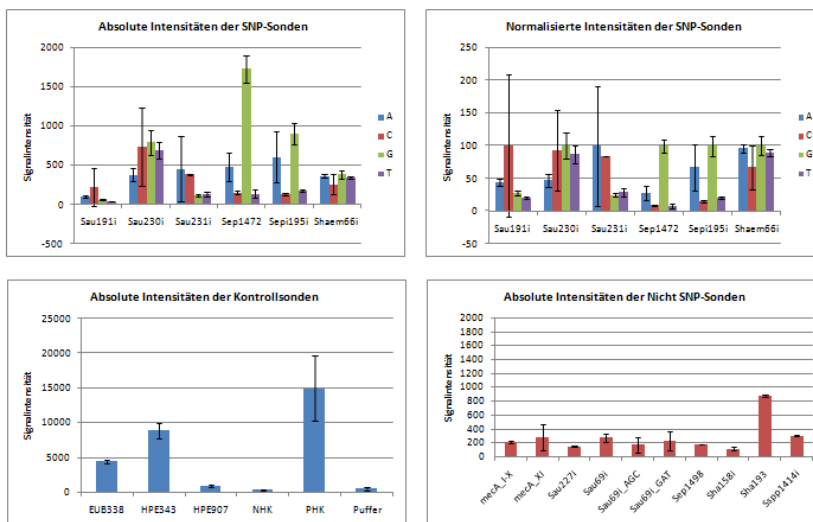


Abbildung 41: Sondensignale vom *S. saprophyticus* (12-00675)-Stamm, Slide 1 und Array 9.

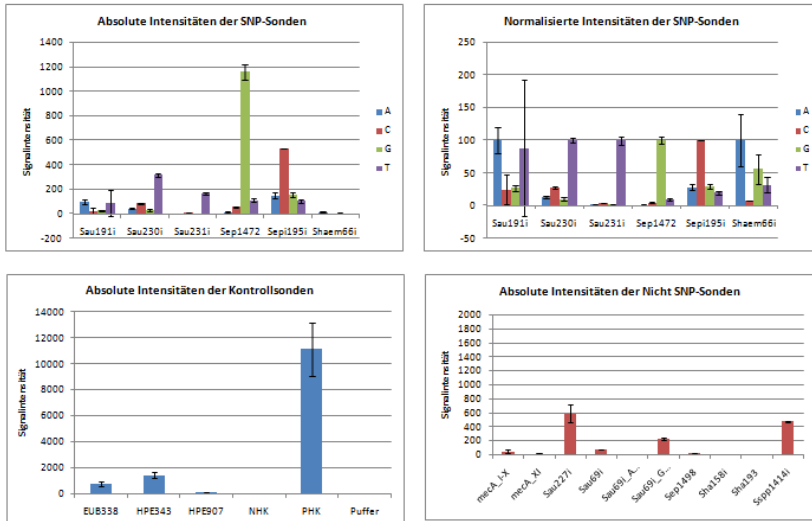


Abbildung 42: Sondensignale vom *S. aureus* (12-00712)-Stamm, Slide 1 und Array 10.

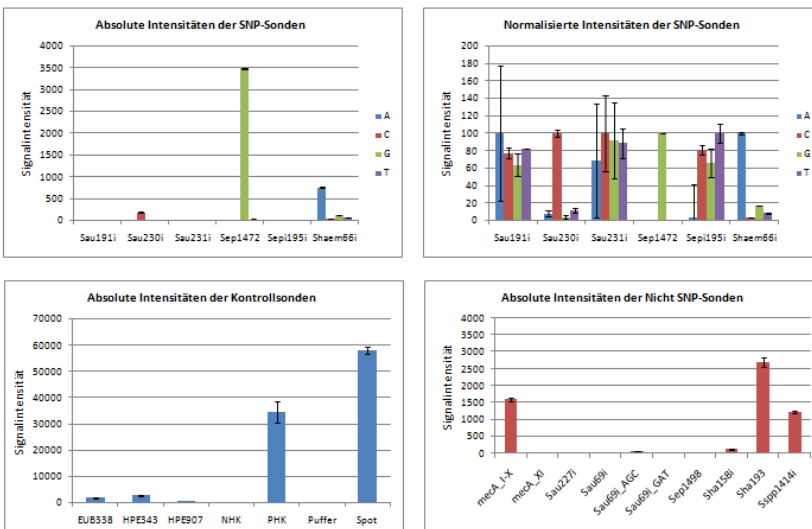


Abbildung 43: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-00812)-Stamm, Slide 2 und Array 1.

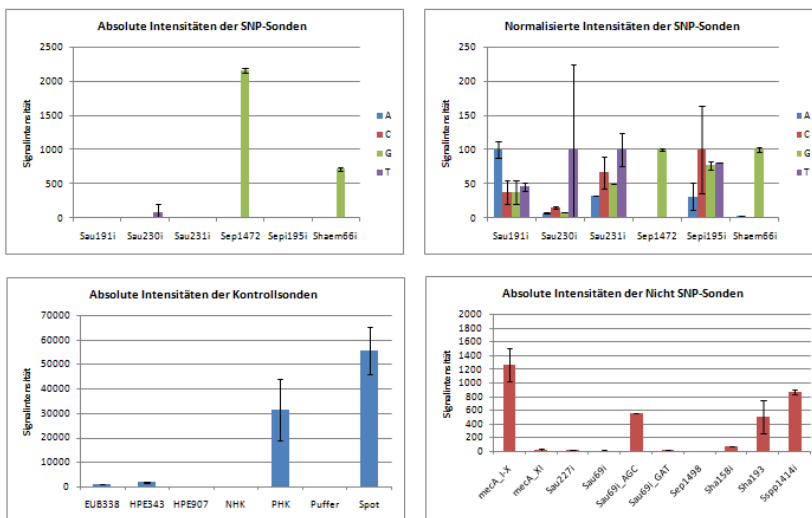


Abbildung 44: Sondensignale vom *S. hominis* (12-00813)-Stamm, Slide 2 und Array 2.

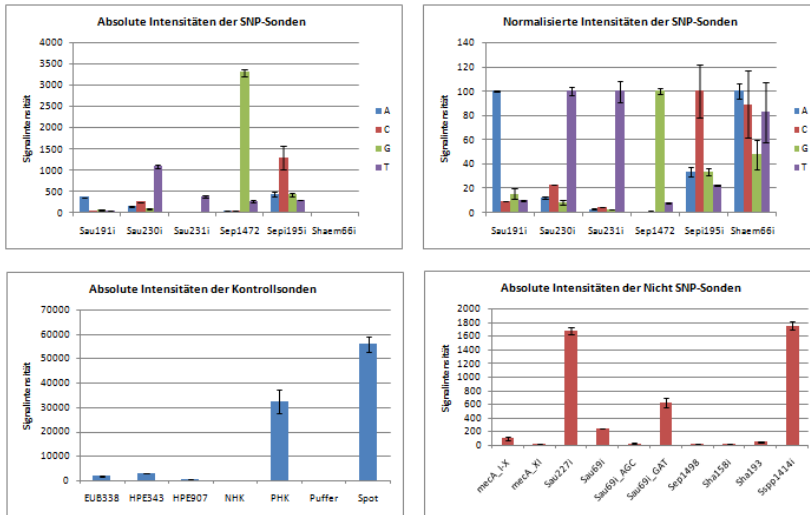


Abbildung 45: Sondensignale vom *S. aureus* (12-00962-3)-Stamm, Slide 2 und Array 3.

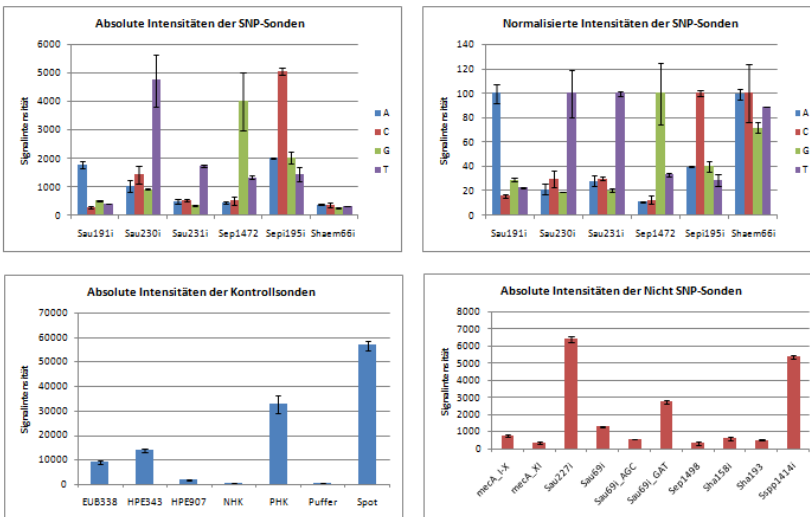


Abbildung 46: Sondensignale vom *S. aureus* (12-00966)-Stamm, Slide 2 und Array 4.

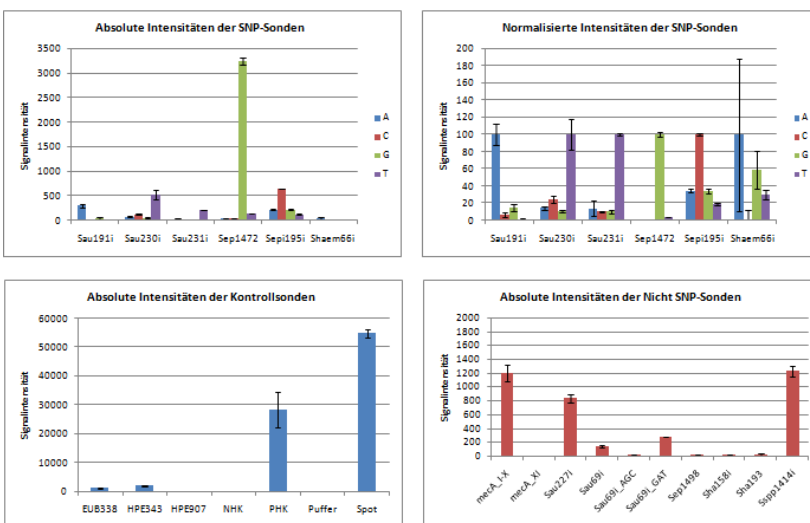


Abbildung 47: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-01000-2)-Stamm, Slide 2 und Array 5.

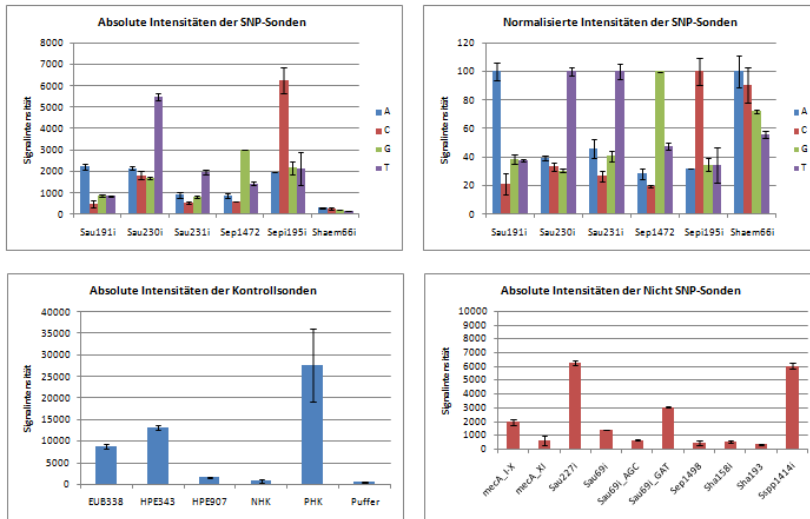


Abbildung 48: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01152)-Stamm, Slide 2 und Array 6.

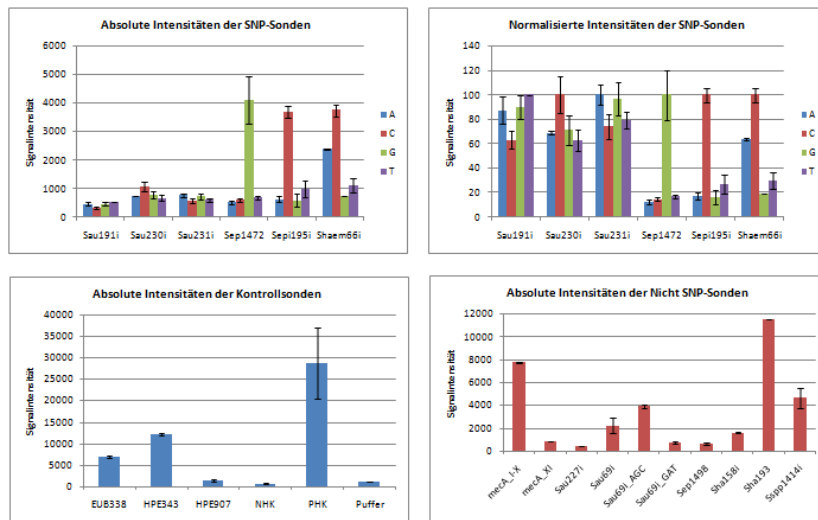


Abbildung 49: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-01171)-Stamm, Slide 2 und Array 7.

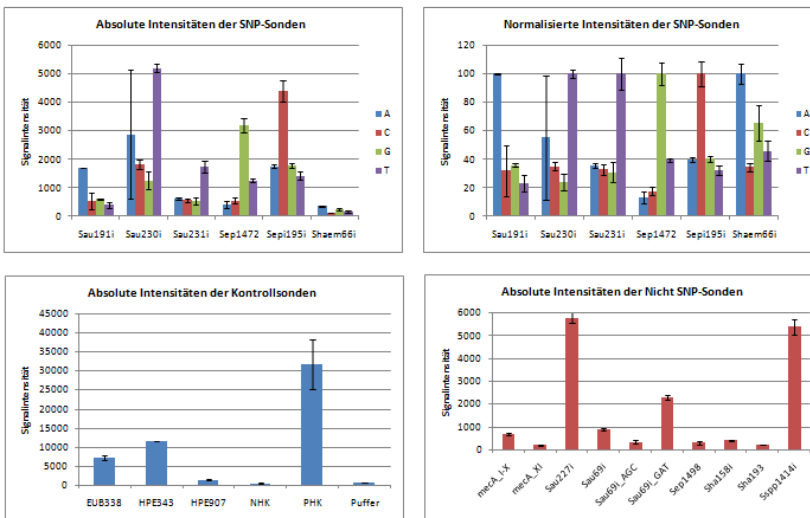


Abbildung 50: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01207)-Stamm, Slide 2 und Array 8.

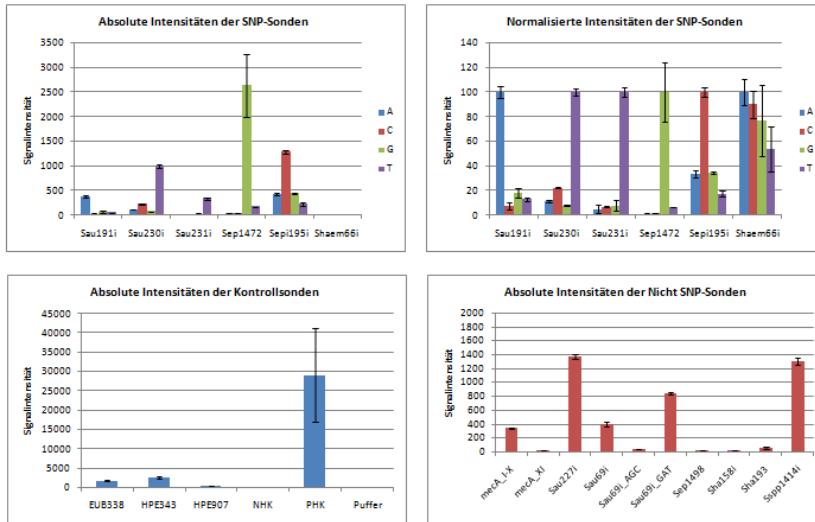


Abbildung 51: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01244-2)-Stamm, Slide 2 und Array 9.

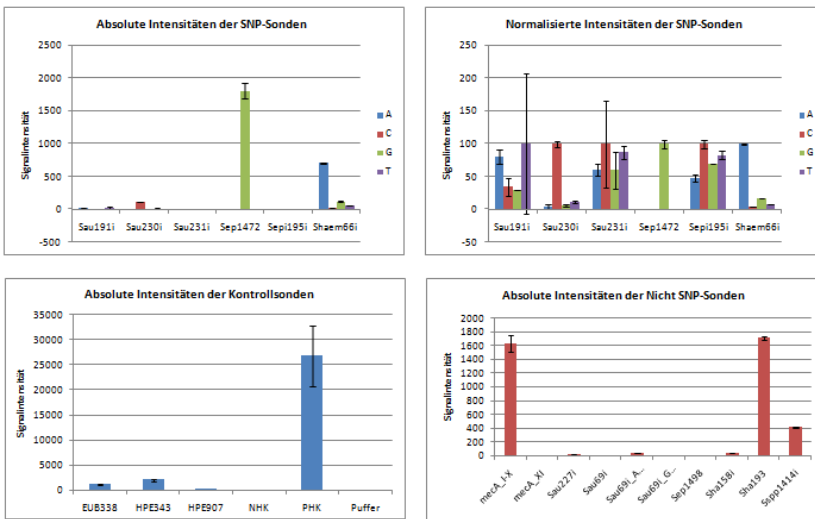


Abbildung 52: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-01261-2)-Stamm, Slide 2 und Array 10.

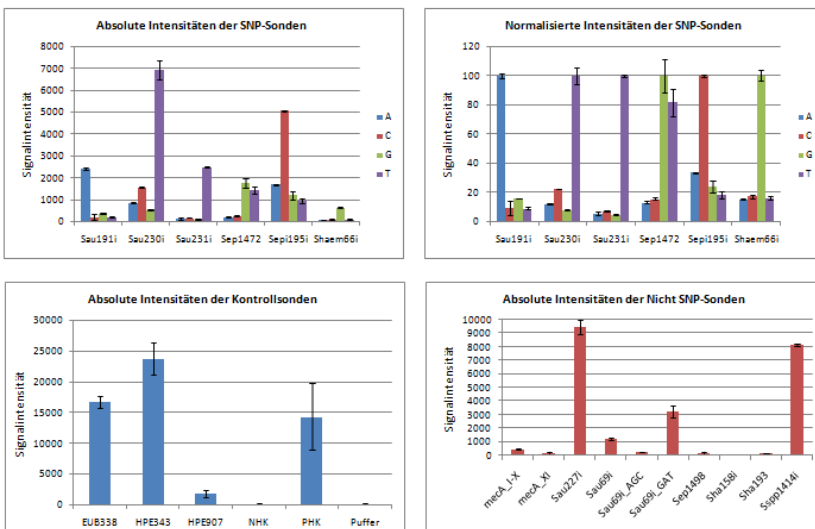


Abbildung 53: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01401)-Stamm, Slide 3 und Array 1.

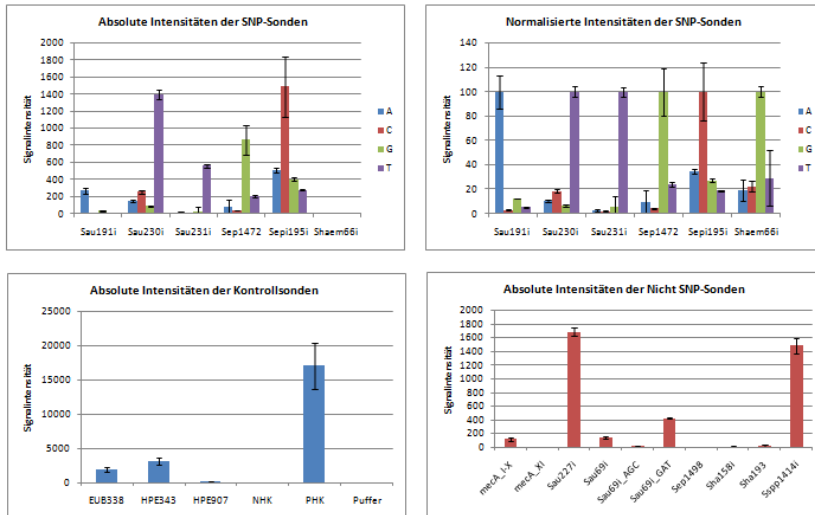


Abbildung 54: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01476)-Stamm, Slide 3 und Array 2.

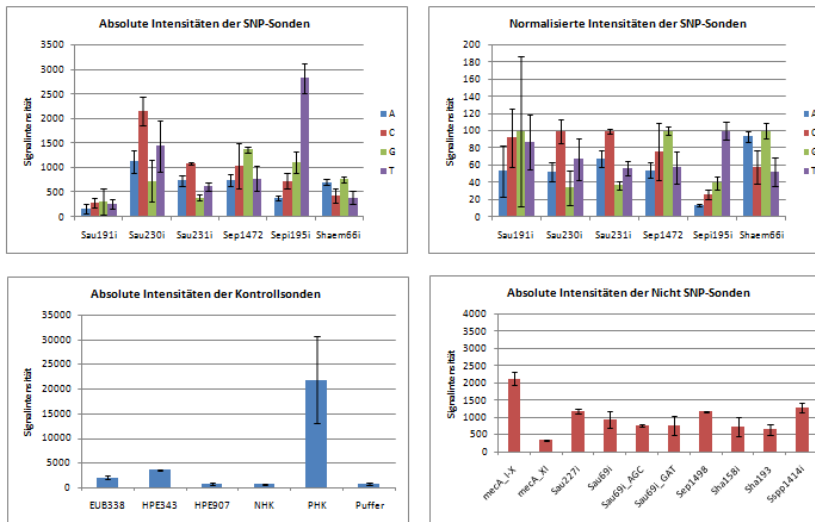


Abbildung 55: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-01536)-Stamm, Slide 3 und Array 3.

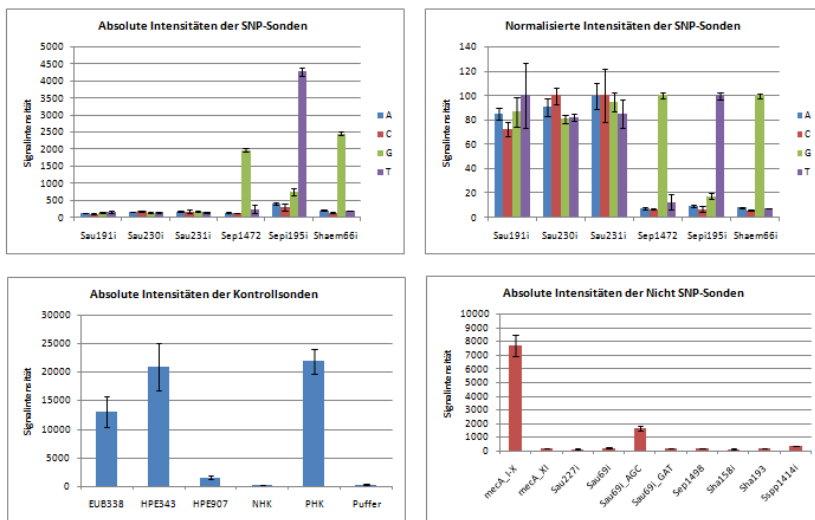


Abbildung 56: Sondensignale vom *S. simulans* (12-01608)-Stamm, Slide 3 und Array 4.

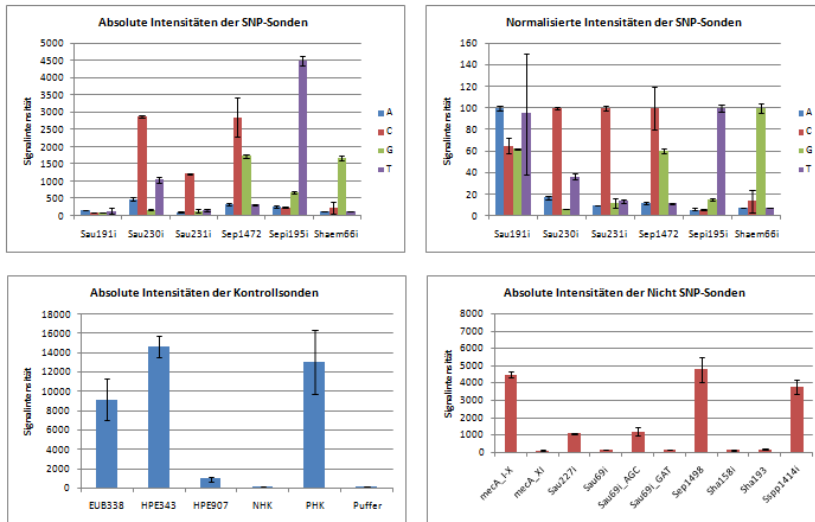


Abbildung 57: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-01631)-Stamm, Slide 3 und Array 5.

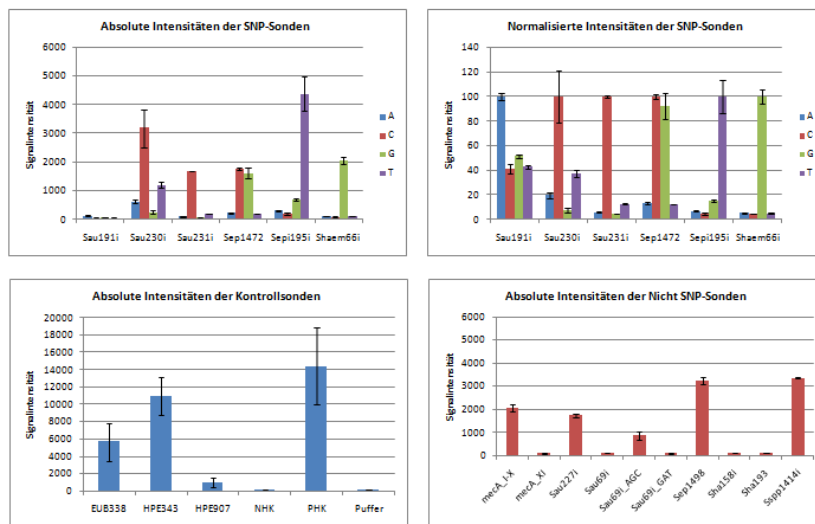


Abbildung 58: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-01795)-Stamm, Slide 3 und Array 6.

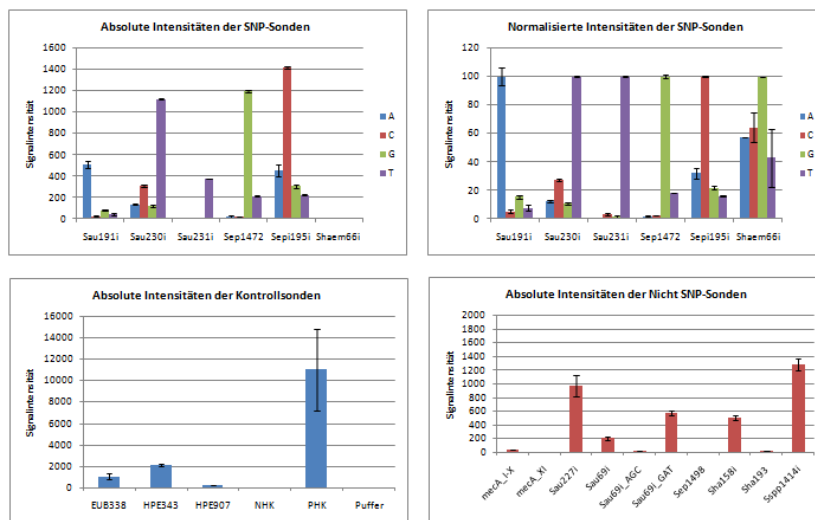


Abbildung 59: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01856-1)-Stamm, Slide 3 und Array 7.

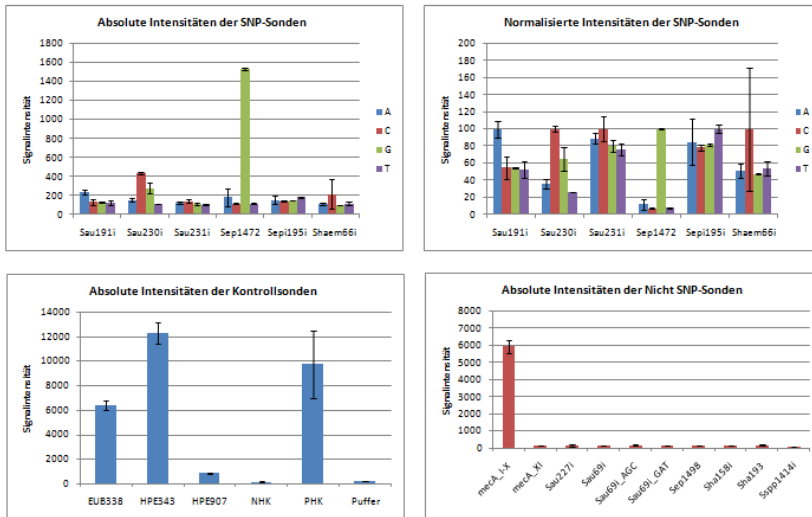


Abbildung 60: Sondensignale vom *S. sciuri* (12-01969)-Stamm, Slide 3 und Array 8.

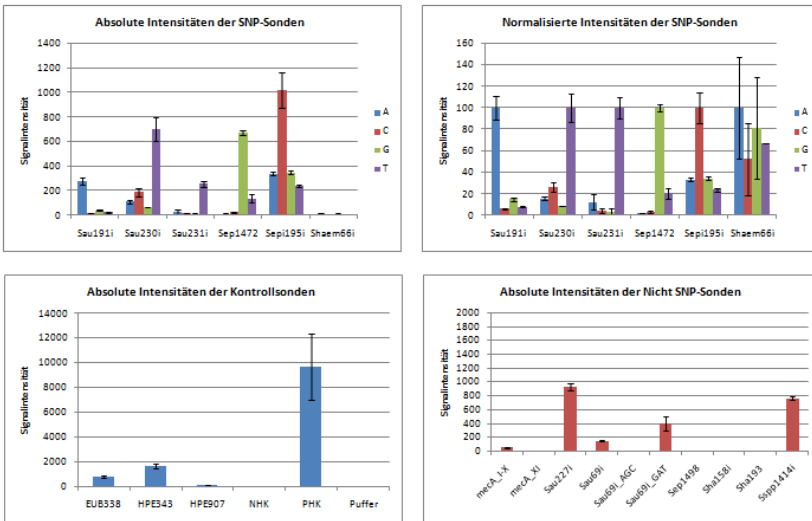


Abbildung 61: Sondensignale vom *S. aureus* (12-01970)-Stamm, Slide 3 und Array 9.

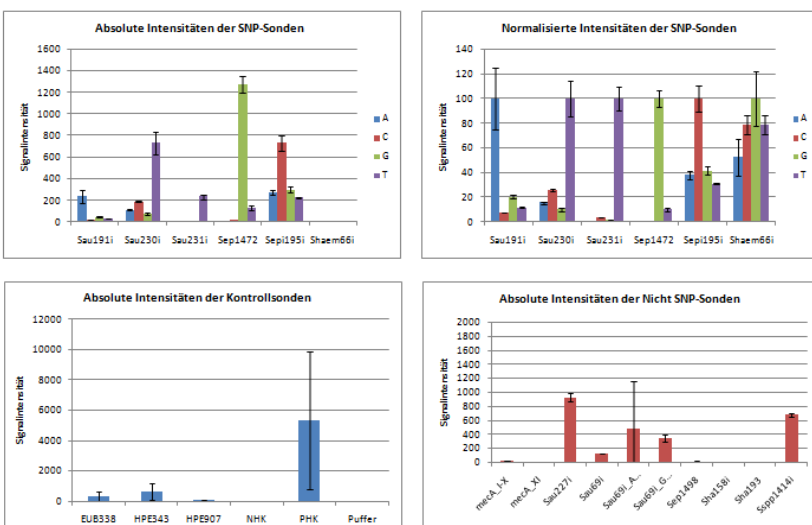


Abbildung 62: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02020)-Stamm, Slide 3 und Array 10.

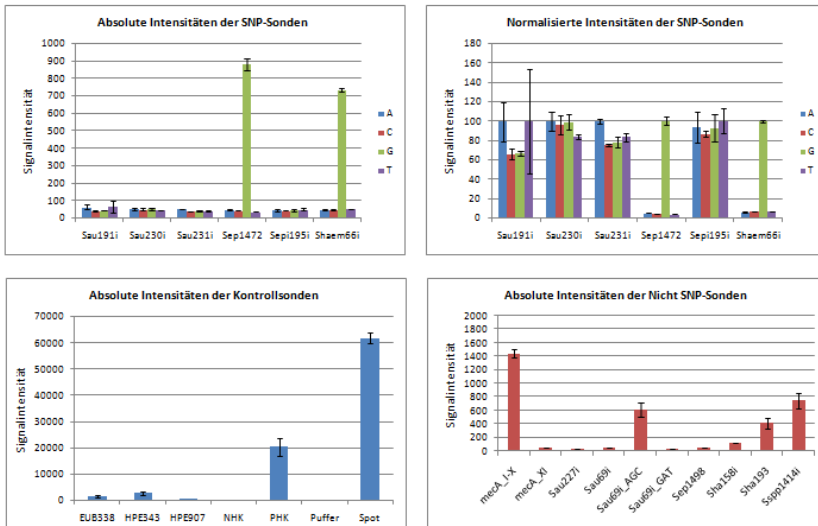


Abbildung 63: Sondensignale vom *S. hominis* (12-02111-2)-Stamm, Slide 4 und Array 1.

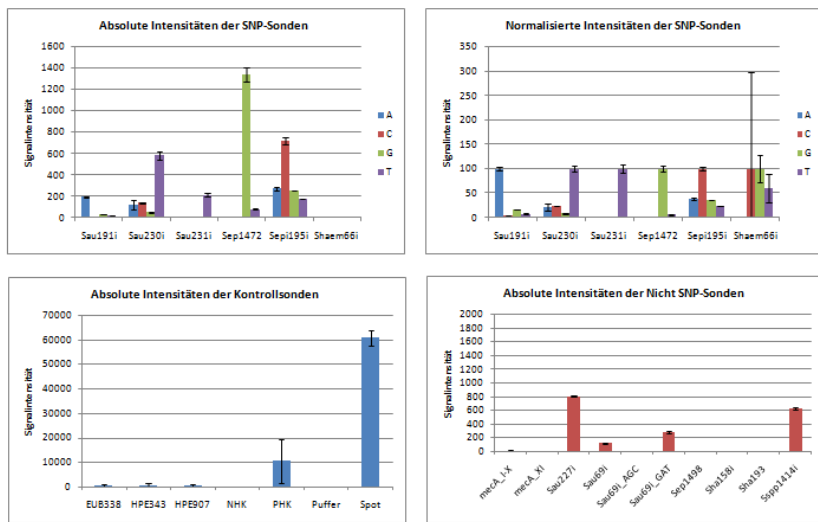


Abbildung 64: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02116)-Stamm, Slide 4 und Array 2.

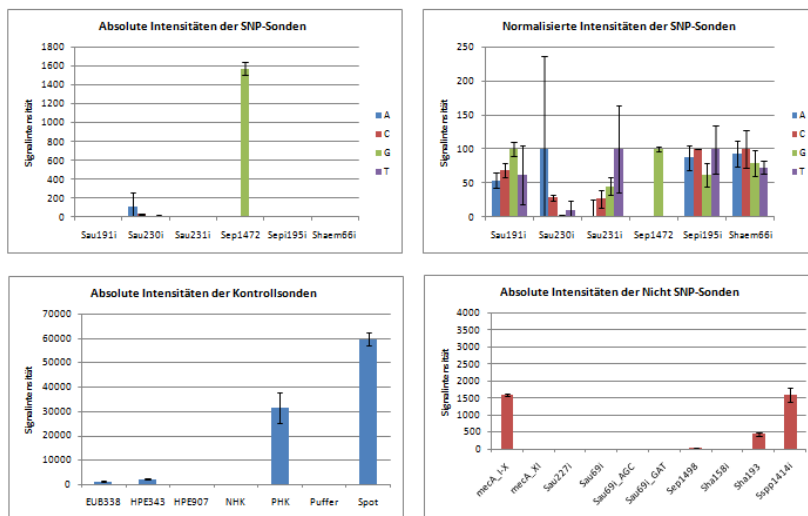


Abbildung 65: Sondensignale vom *S. lugdunensis* (12-02275)-Stamm, Slide 4 und Array 3.

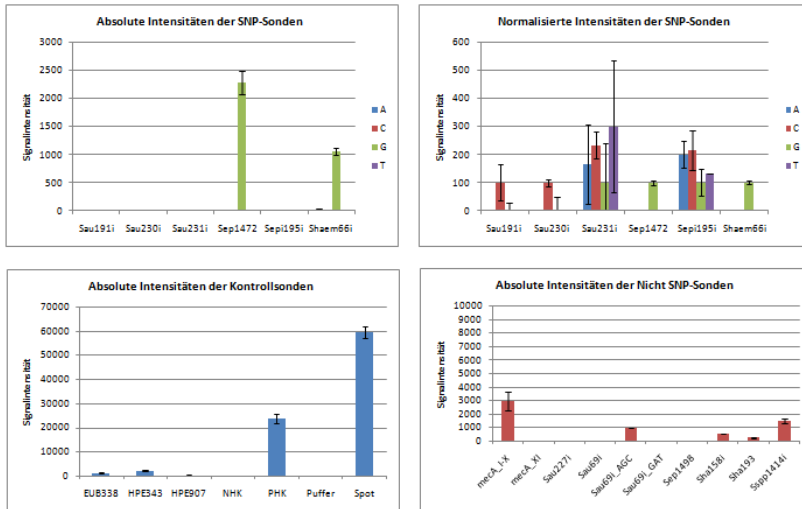


Abbildung 66: Sondensignale vom *S. hominis* (12-02364)-Stamm, Slide 4 und Array 4.

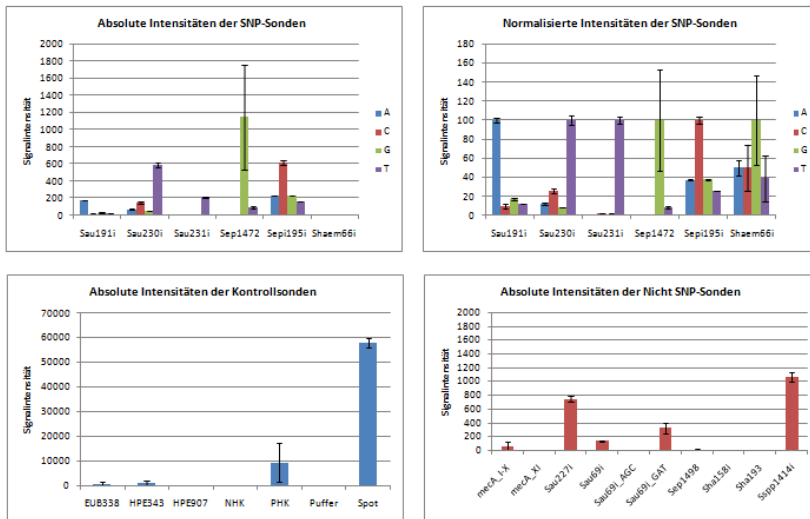


Abbildung 67: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02373)-Stamm, Slide 4 und Array 5.

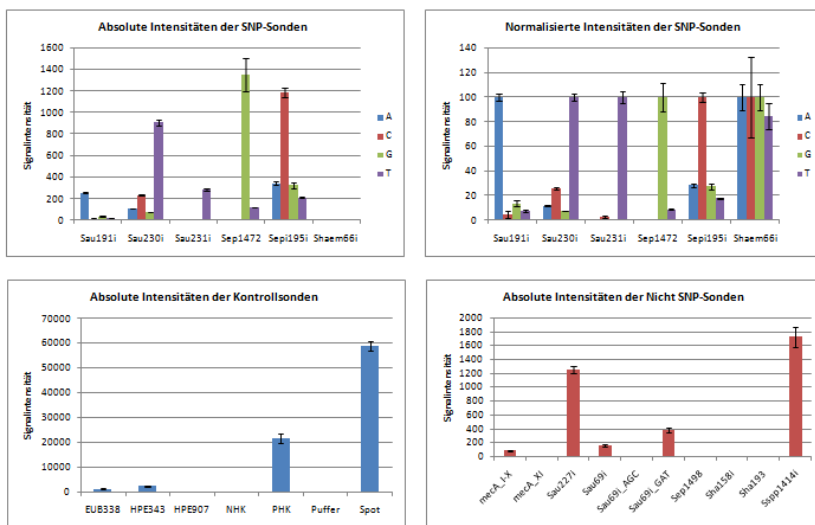


Abbildung 68: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02462)-Stamm, Slide 4 und Array 6.

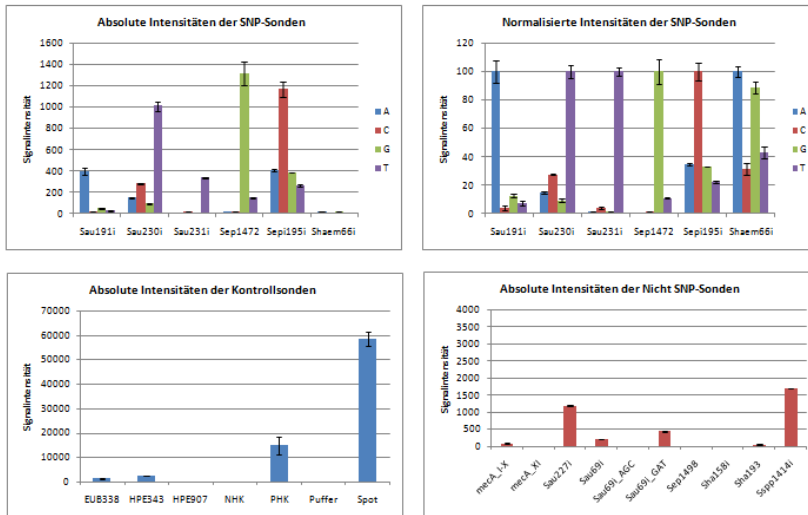


Abbildung 69: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02470)-Stamm, Slide 4 und Array 7.

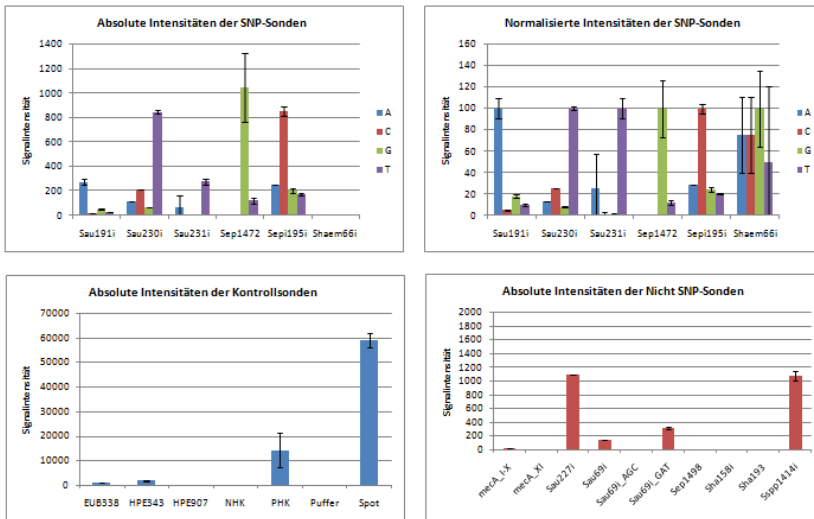


Abbildung 70: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02519)-Stamm, Slide 4 und Array 8.

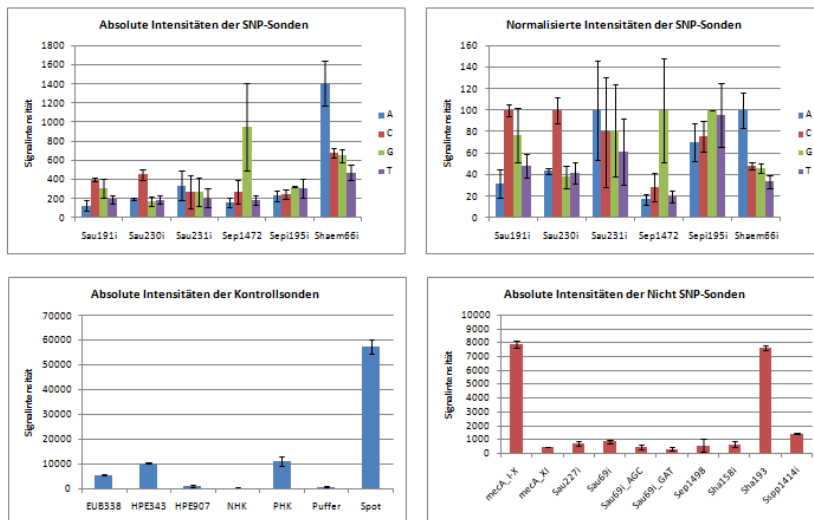


Abbildung 71: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-02616)-Stamm, Slide 4 und Array 9.

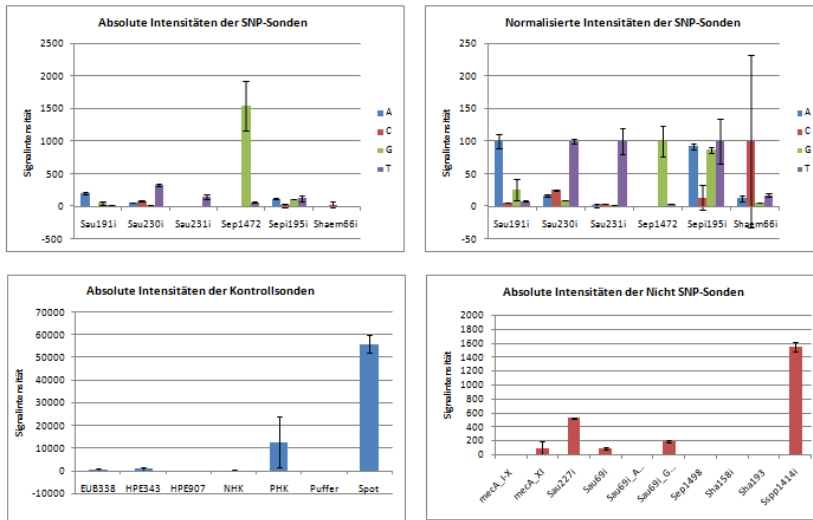


Abbildung 72: Sondensignale vom *S. Aureus* (12-02846)-Stamm, Slide 4 und Array 10.

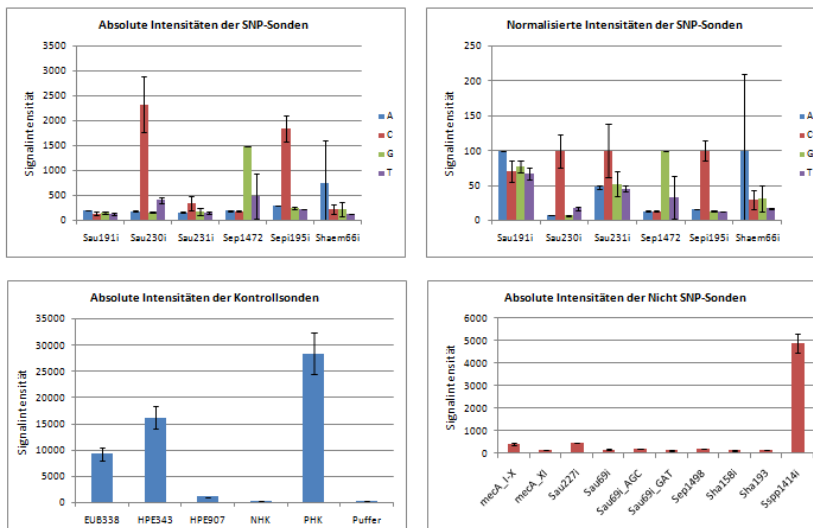


Abbildung 73: Sondensignale vom *S. Warneri* (12-02218)-Stamm, Slide 5 und Array 1.

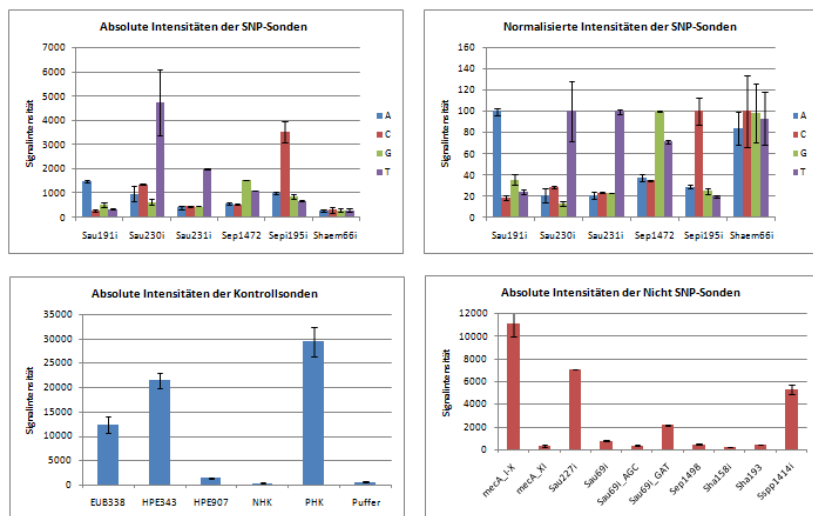


Abbildung 74: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02314)-Stamm, Slide 5 und Array 2.

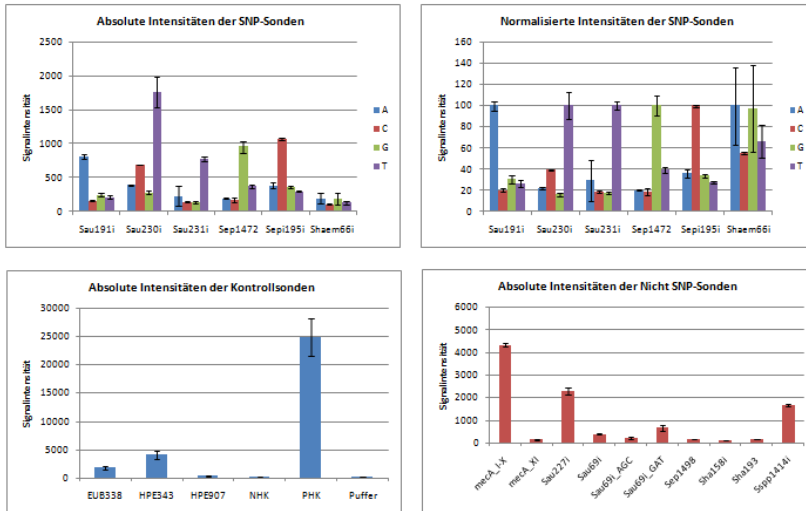


Abbildung 75: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02369)-Stamm, Slide 5 und Array 3.

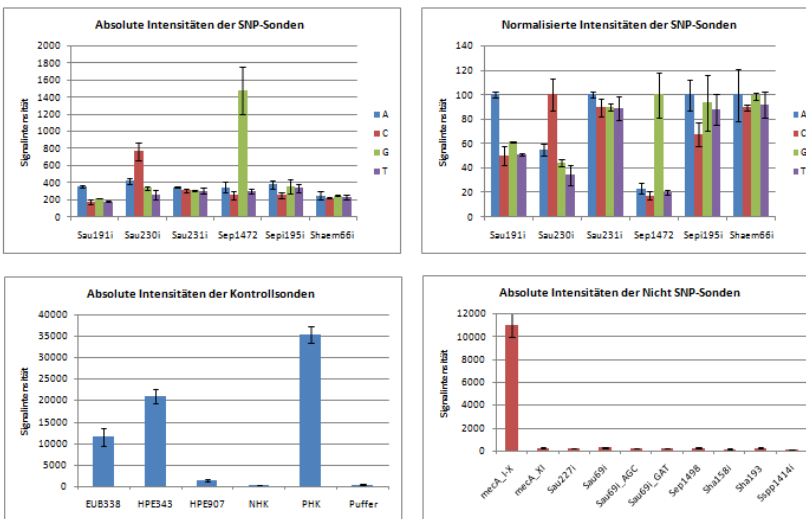


Abbildung 76: Sondensignale vom *S. sciuri* (12-02407)-Stamm, Slide 5 und Array 4.

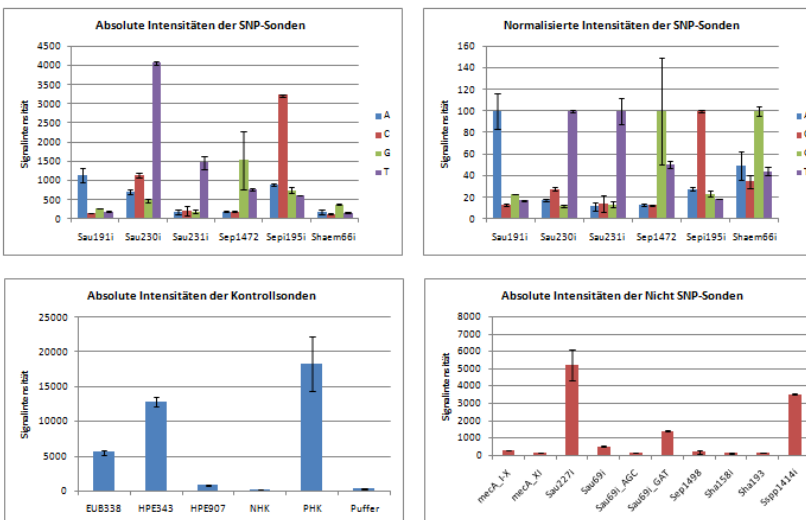


Abbildung 77: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02459)-Stamm, Slide 5 und Array 5.

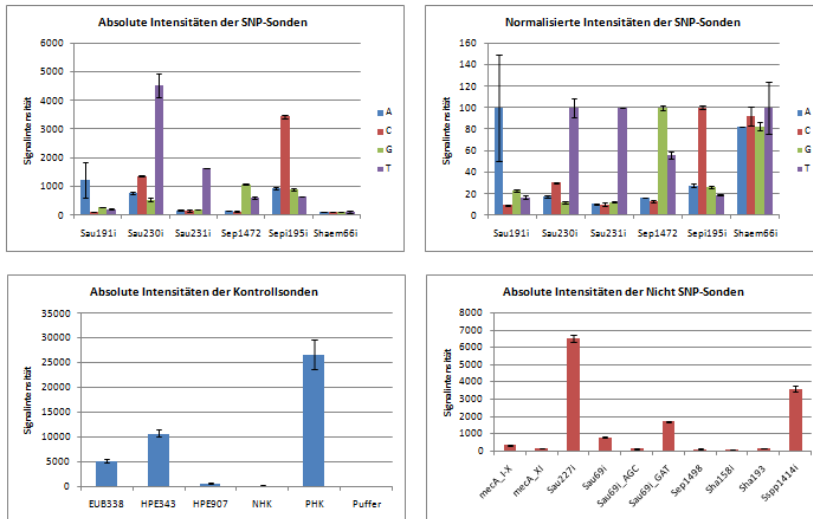


Abbildung 78: Sondensignale vom *S. Aureus* (12-02603)-Stamm, Slide 5 und Array 6.

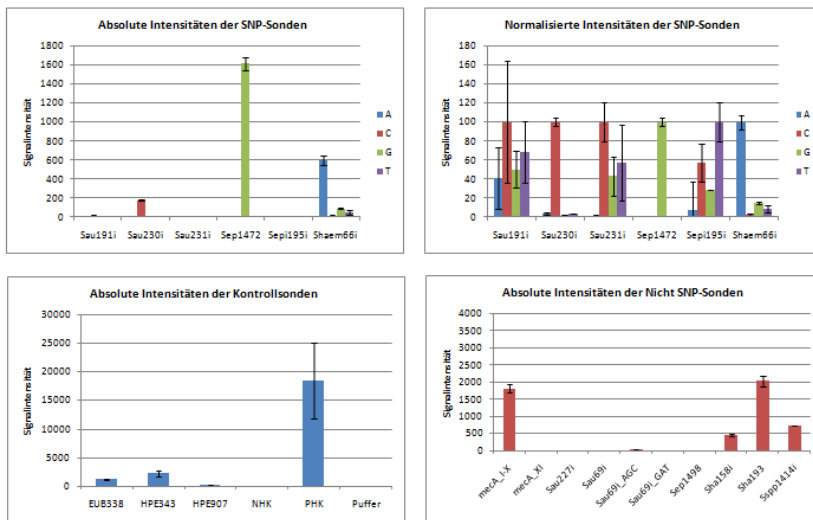


Abbildung 79: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-02612)-Stamm, Slide 5 und Array 7.

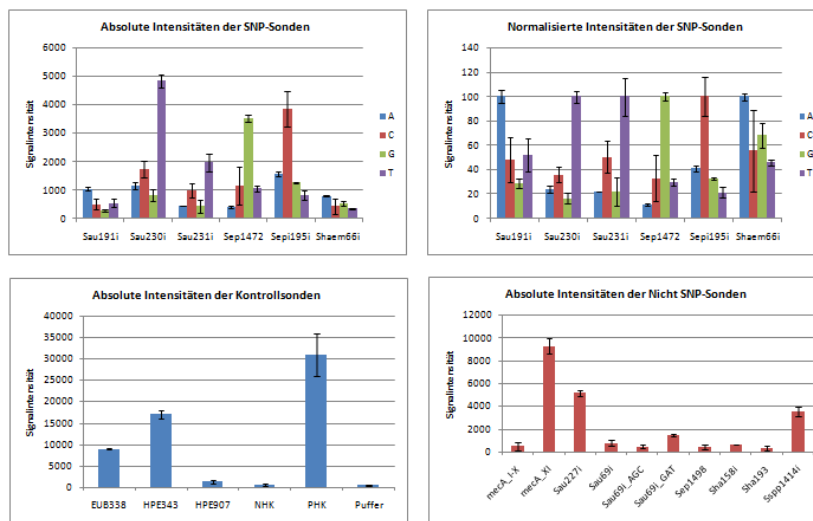


Abbildung 80: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02736)-Stamm, Slide 5 und Array 8.

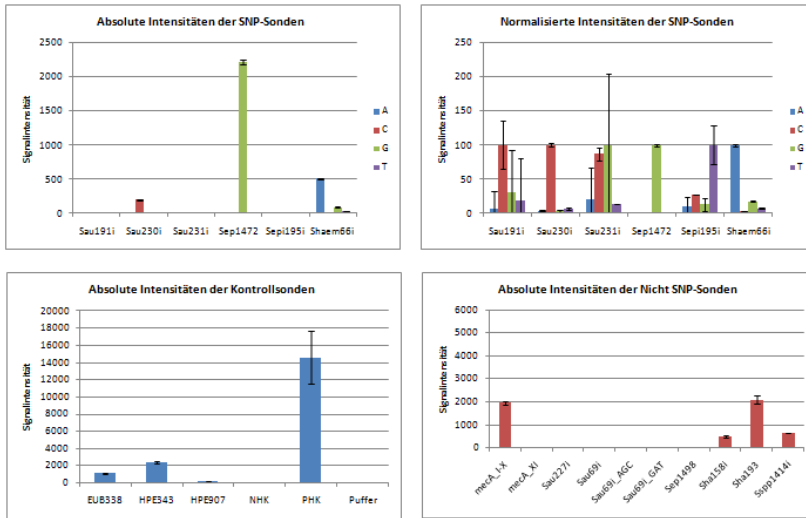


Abbildung 81: Sondensignale vom *S. warneri* (12-02757)-Stamm, Slide 5 und Array 9.

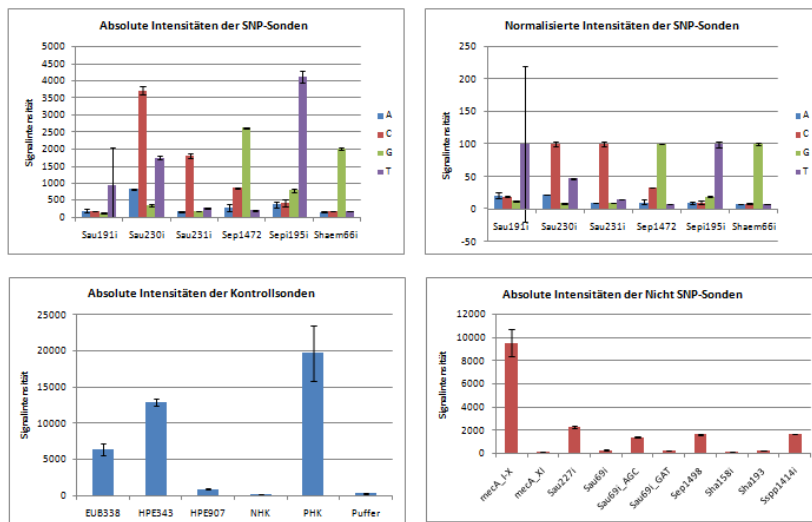


Abbildung 82: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-02762)-Stamm, Slide 5 und Array 10.

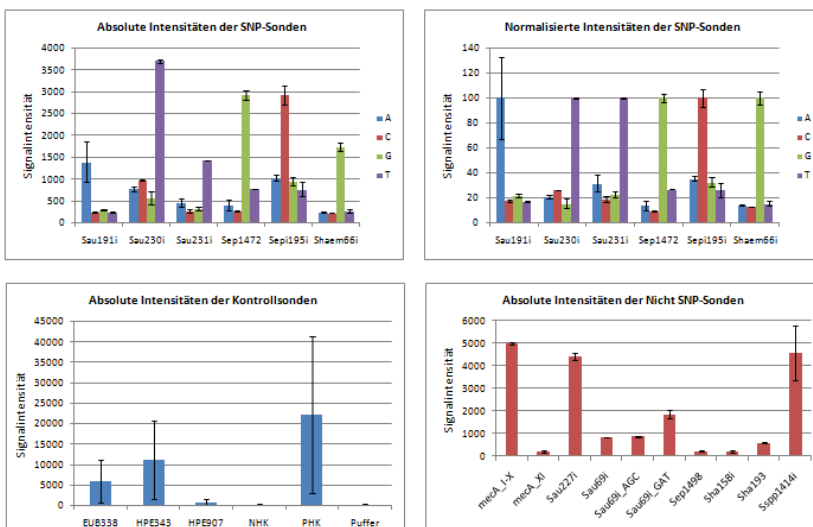


Abbildung 83: Sondensignale vom *S. hominis* (12-02047)-Stamm, Slide 6 und Array 1.

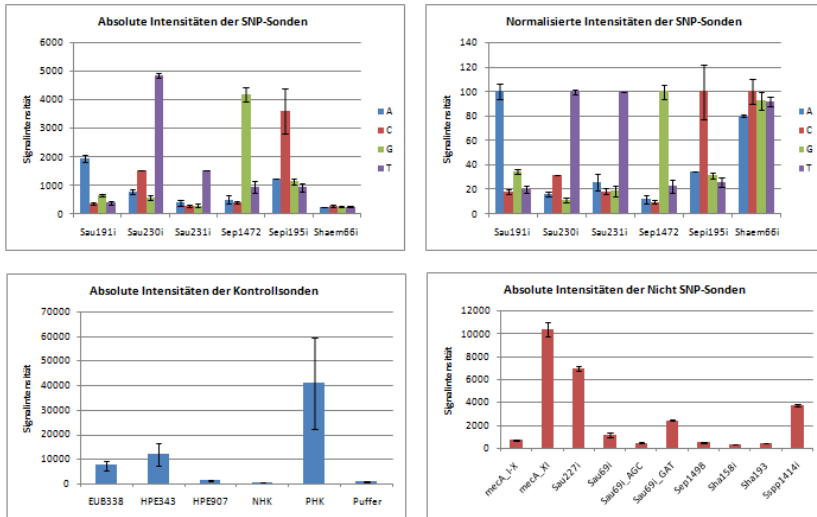


Abbildung 84: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02743)-Stamm, Slide 6 und Array 2.

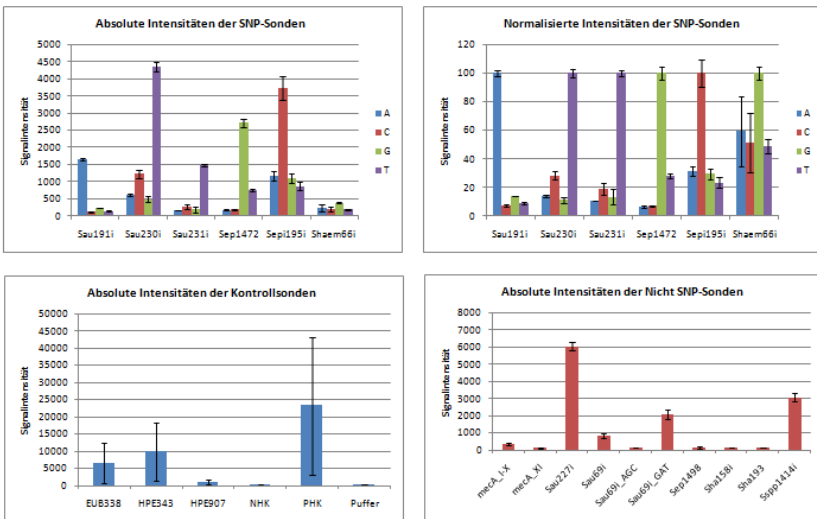


Abbildung 85: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02776)-Stamm, Slide 6 und Array 3.

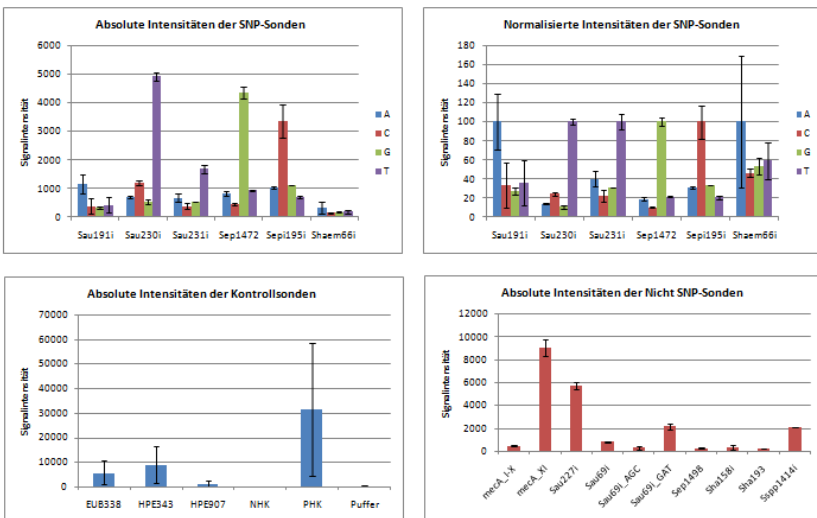


Abbildung 86: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02794)-Stamm, Slide 6 und Array 4.

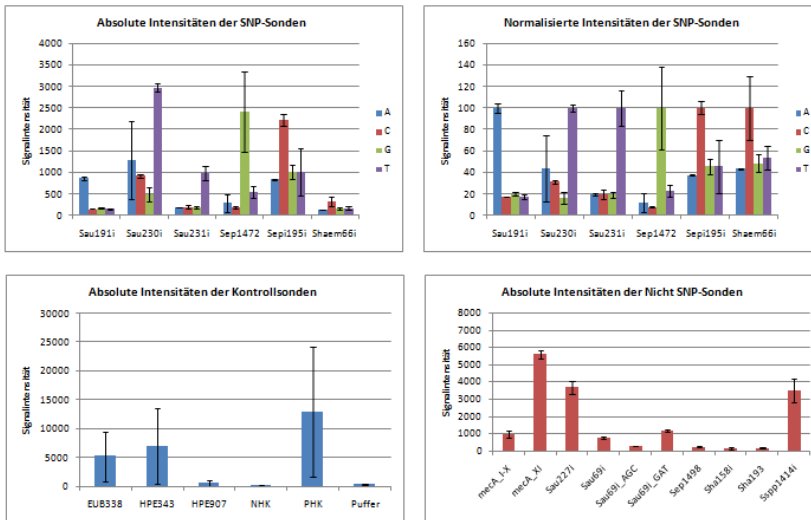


Abbildung 87: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02797)-Stamm, Slide 6 und Array 5.

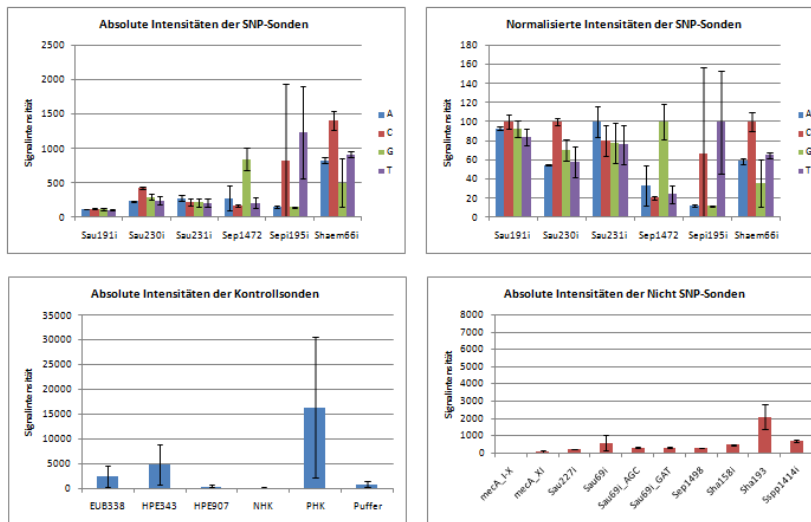


Abbildung 88: Sondensignale vom *S. lugdunensis* (12-02810-3)-Stamm, Slide 6 und Array 6.

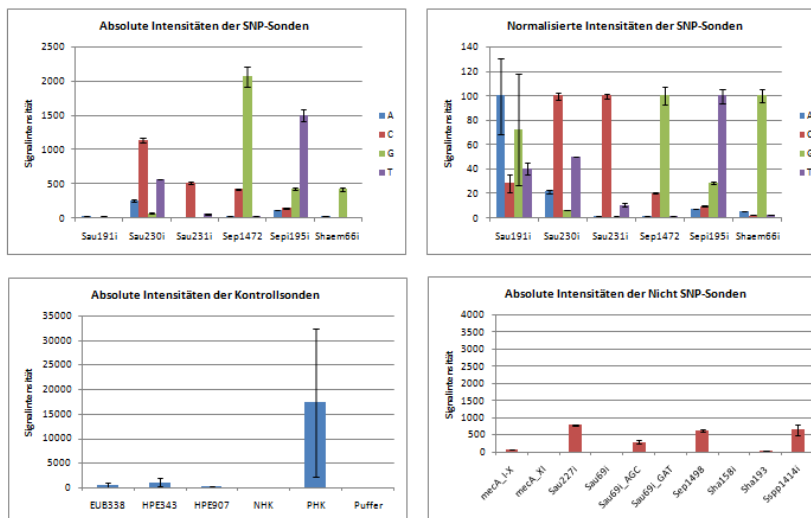


Abbildung 89: Sondensignale vom *S. epidermidis* (12-02812-2)-Stamm, Slide 6 und Array 7.

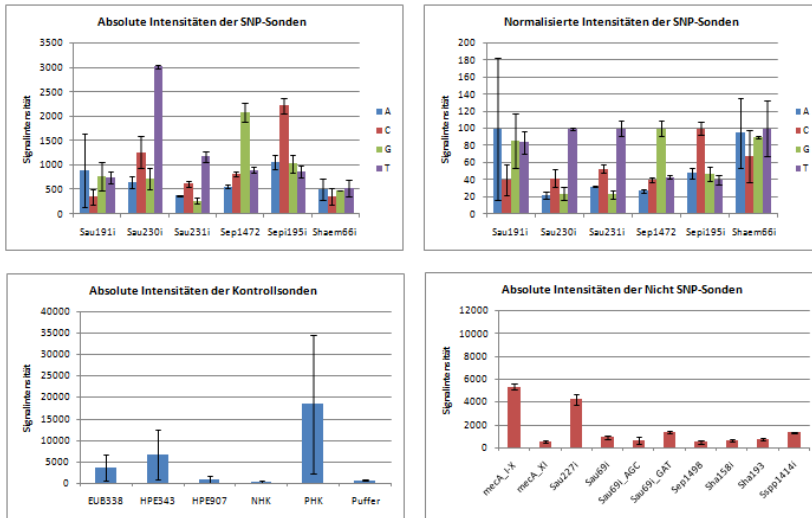


Abbildung 90: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02813)-Stamm, Slide 6 und Array 8.

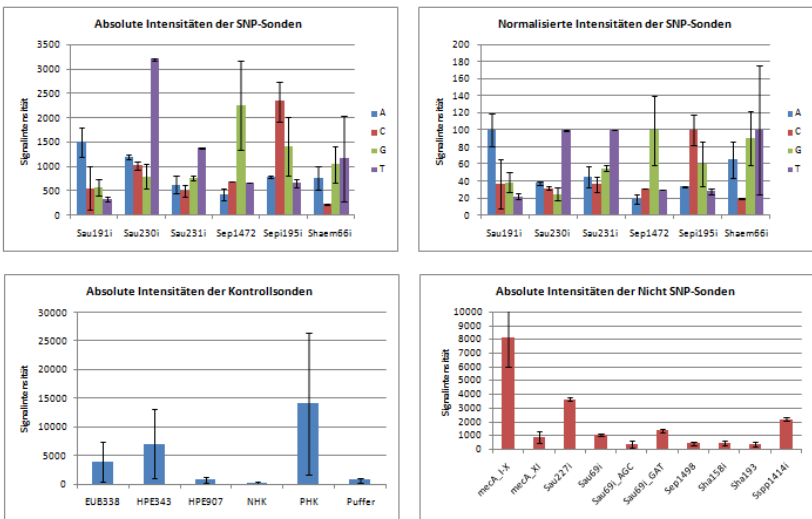


Abbildung 91: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02823)-Stamm, Slide 6 und Array 9.

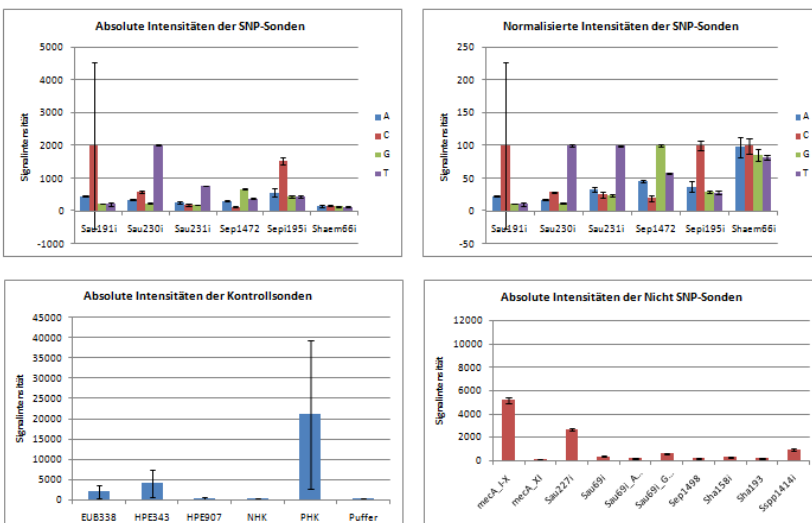


Abbildung 92: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02831)-Stamm, Slide 6 und Array 10.

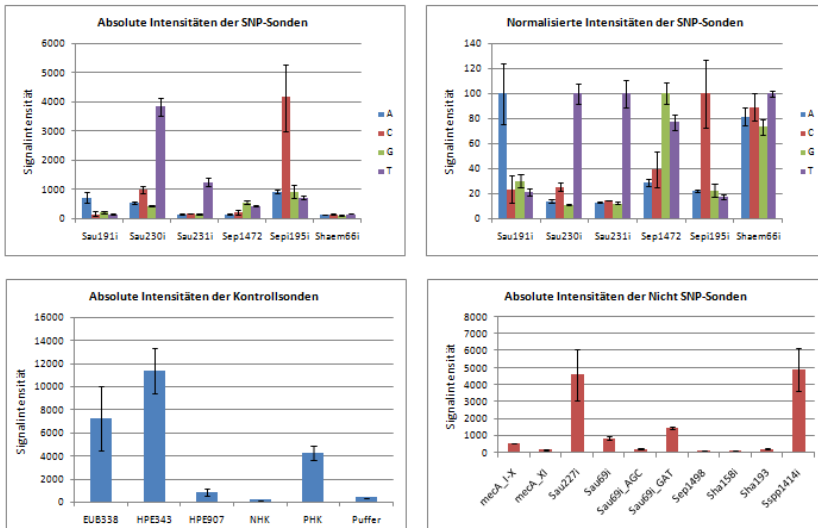


Abbildung 93: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02835)-Stamm, Slide 7 und Array 1.

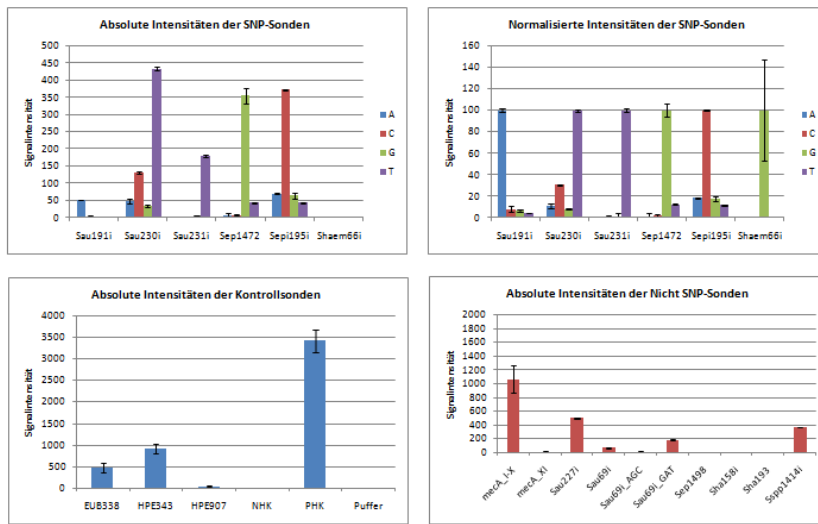


Abbildung 94: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02848)-Stamm, Slide 7 und Array 2.

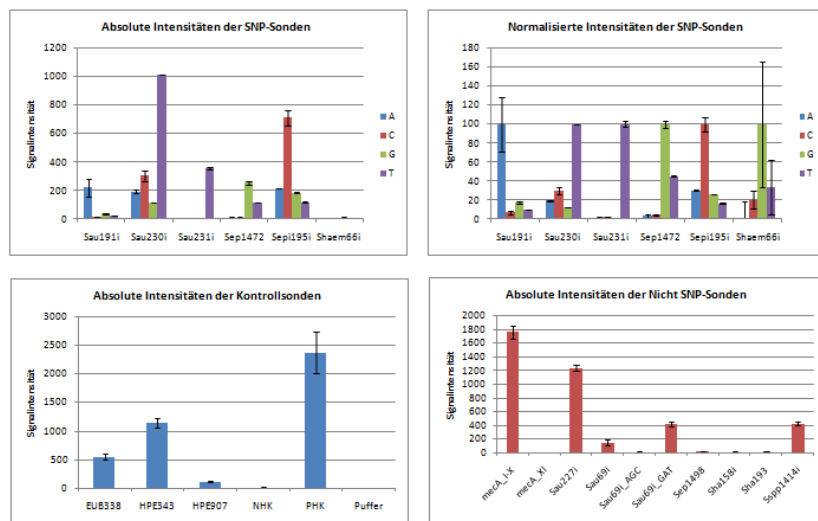


Abbildung 95: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02850)-Stamm, Slide 7 und Array 3.

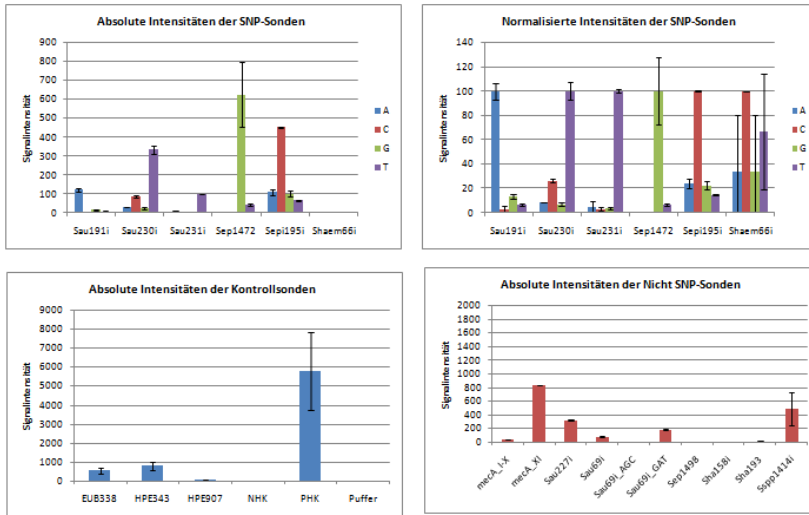


Abbildung 96: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02875)-Stamm, Slide 7 und Array 4.

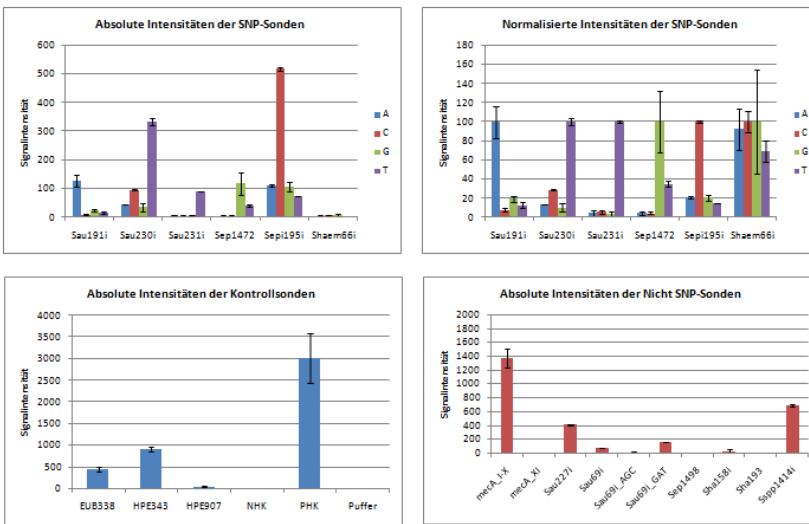


Abbildung 97: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02877)-Stamm, Slide 7 und Array 5.

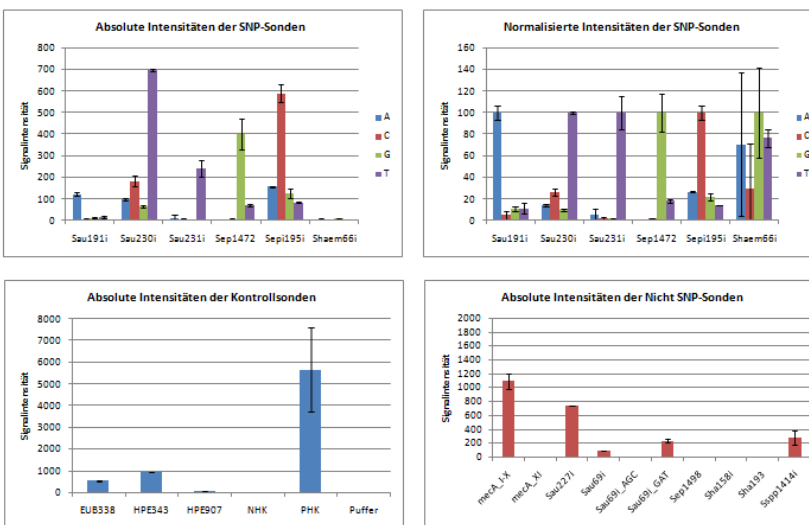


Abbildung 98: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02882)-Stamm, Slide 7 und Array 6.

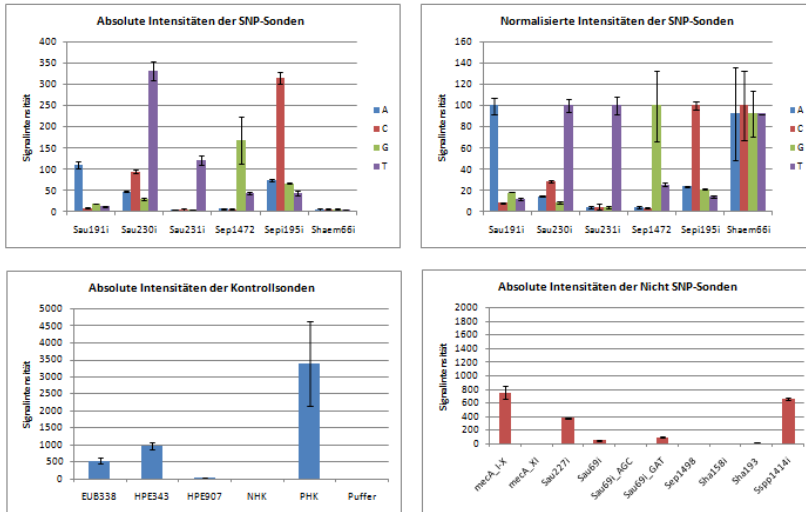


Abbildung 99: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02888)-Stamm, Slide 7 und Array 7.

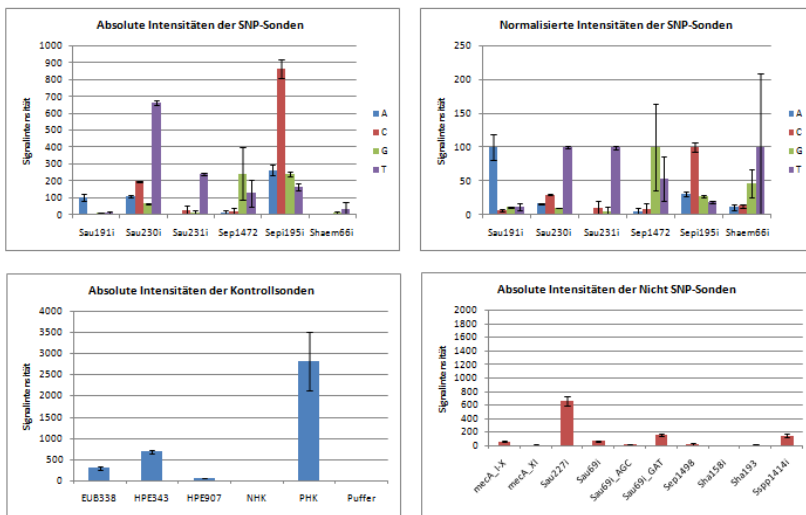


Abbildung 100: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02890-1)-Stamm, Slide 7 und Array 8.

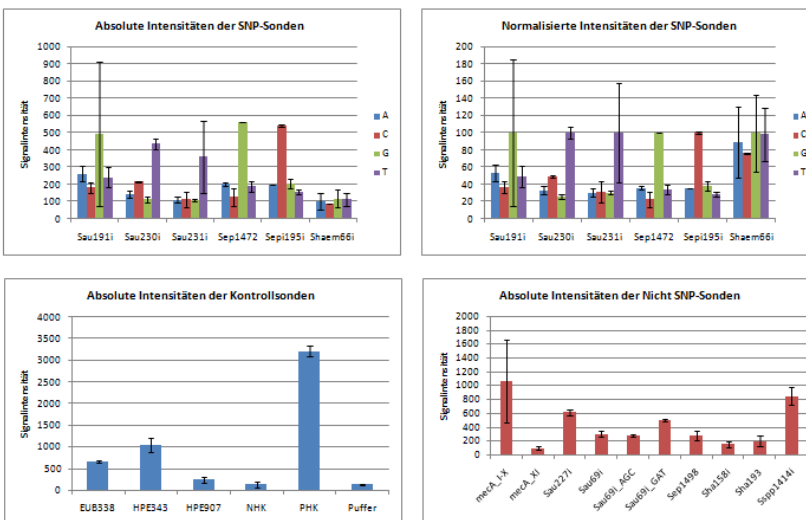


Abbildung 101: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02895)-Stamm, Slide 7 und Array 9.

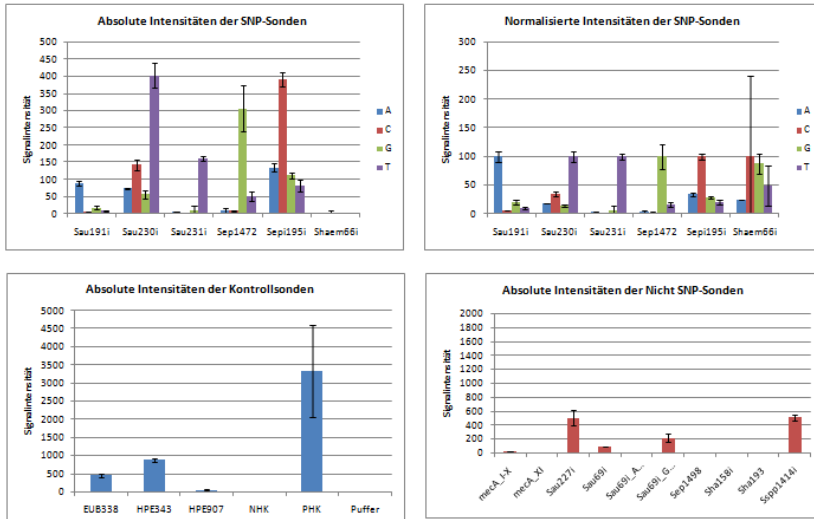


Abbildung 102: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02923)-Stamm, Slide 7 und Array 10.

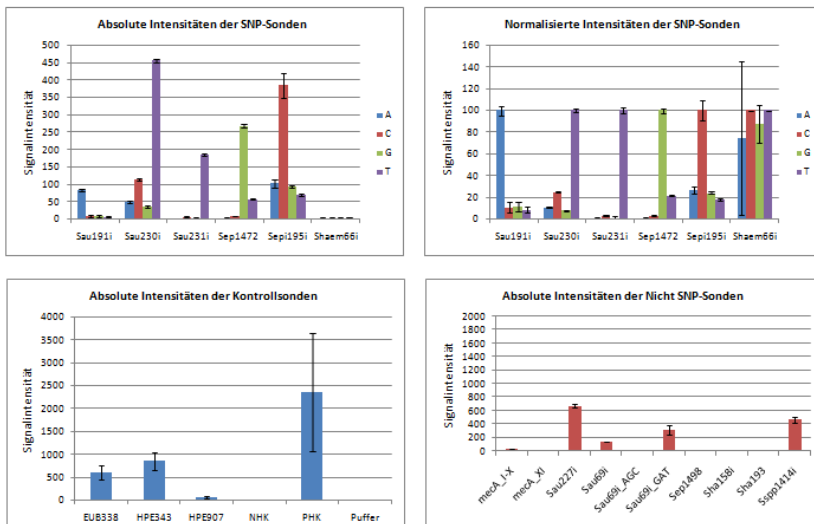


Abbildung 103: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02929)-Stamm, Slide 8 und Array 1.

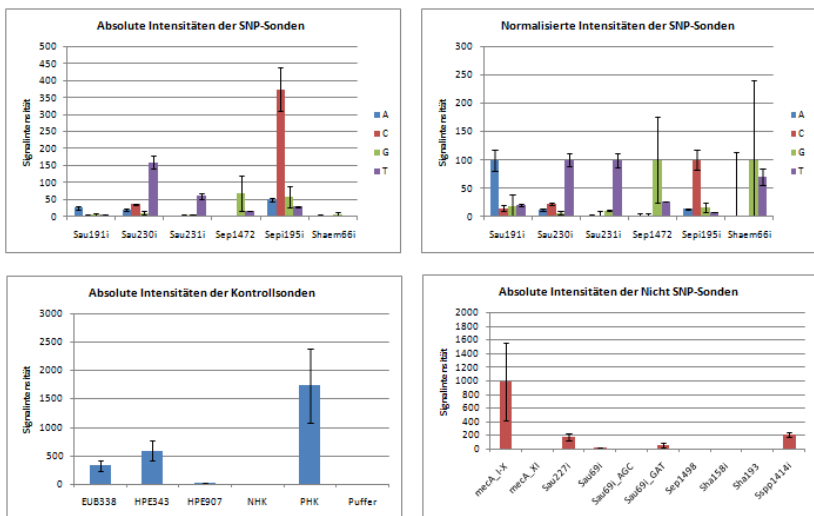


Abbildung 104: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02948)-Stamm, Slide 8 und Array 2.

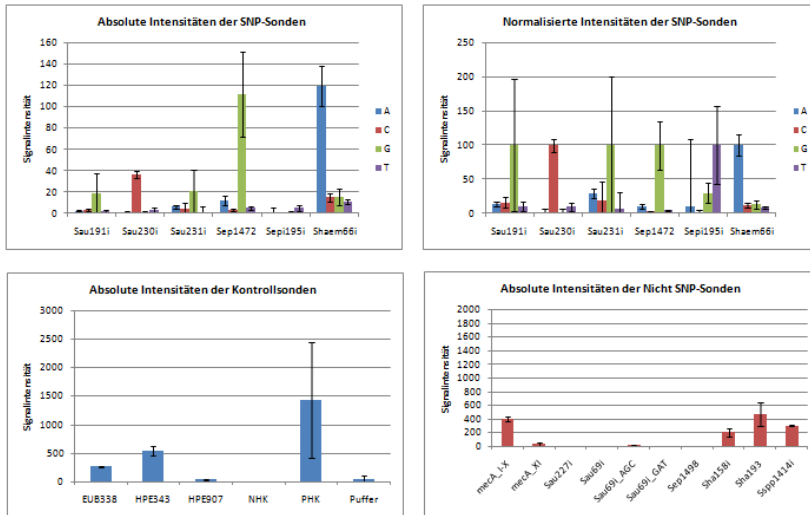


Abbildung 105: Sondensignale vom *S. haemolyticus* (12-02951)-Stamm, Slide 8 und Array 3.

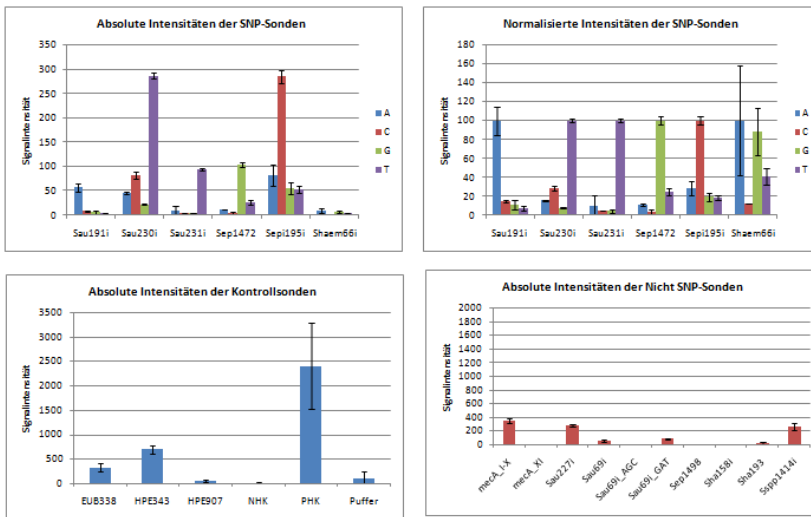


Abbildung 106: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02955)-Stamm, Slide 8 und Array 4.

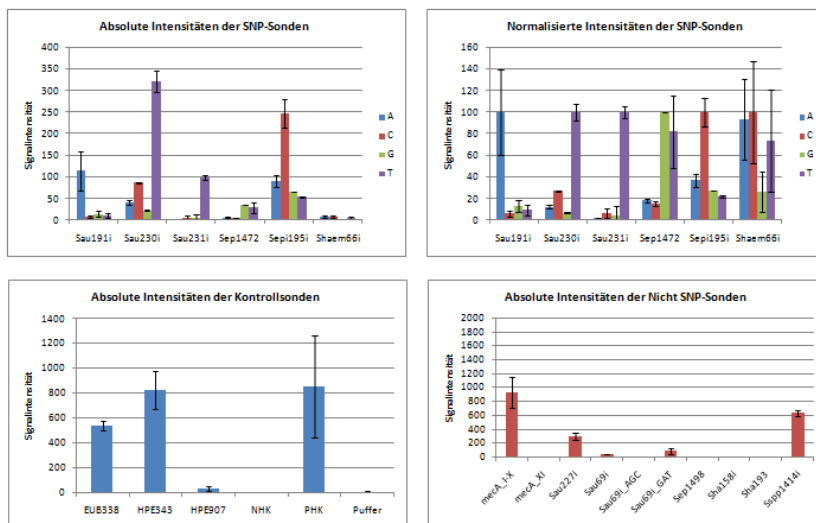


Abbildung 107: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02962)-Stamm, Slide 8 und Array 5.

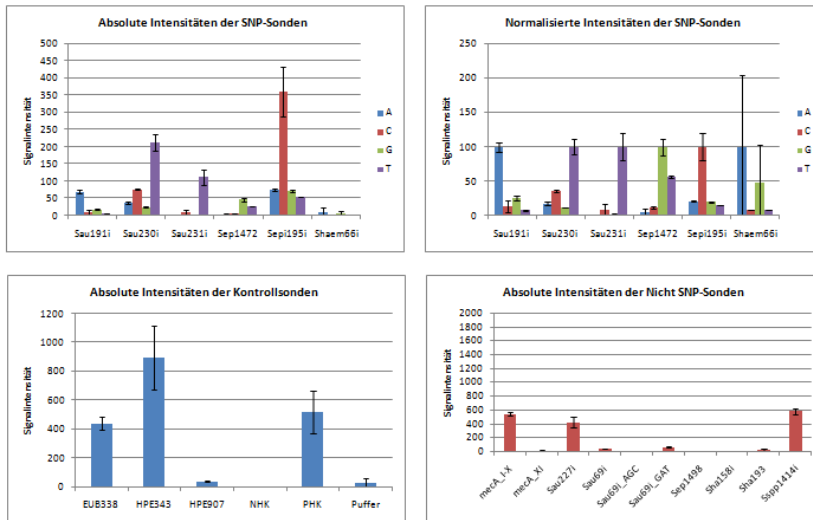


Abbildung 108: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02974)-Stamm, Slide 8 und Array 6.

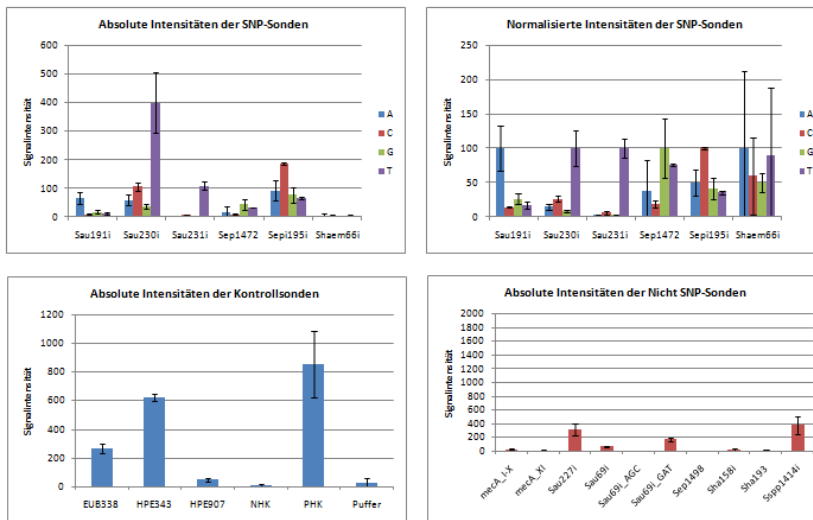


Abbildung 109: Sondensignale vom *S. aureus* (12-02967)-Stamm, Slide 8 und Array 7.

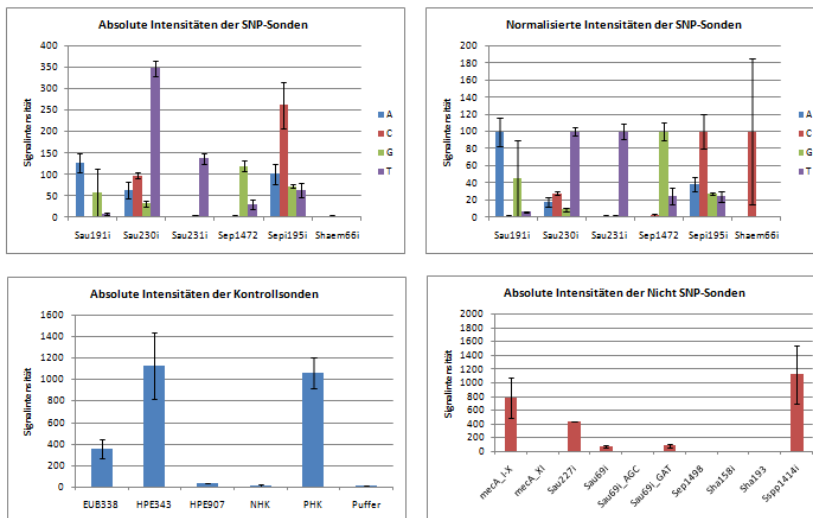


Abbildung 110: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03008-2)-Stamm, Slide 8 und Array 8.

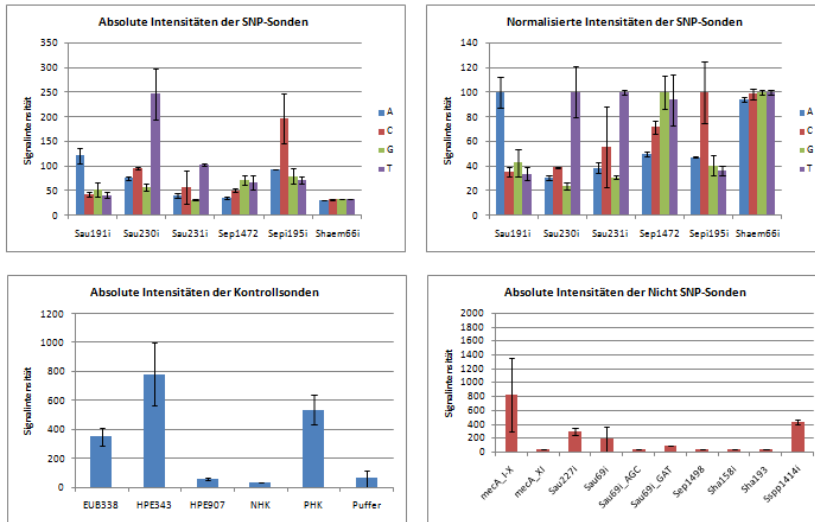


Abbildung 111: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03080)-Stamm, Slide 8 und Array 9.

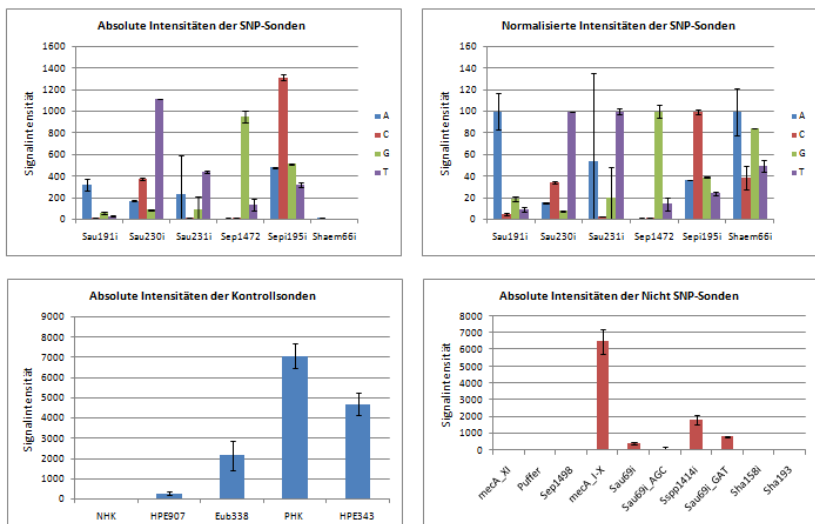


Abbildung 112: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03094)-Stamm, Slide 8 und Array 10.

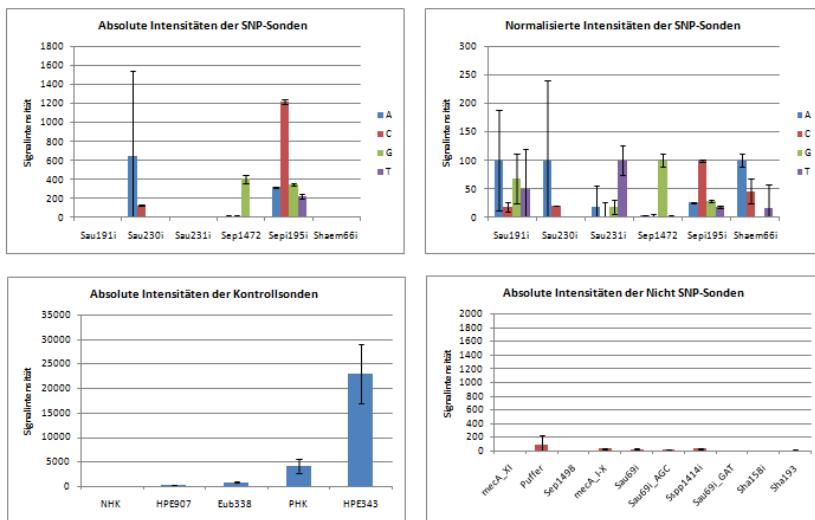


Abbildung 113: Sondensignale vom *S. pseudintermedius* (12-03098)-Stamm, Slide 9 und Array 1.

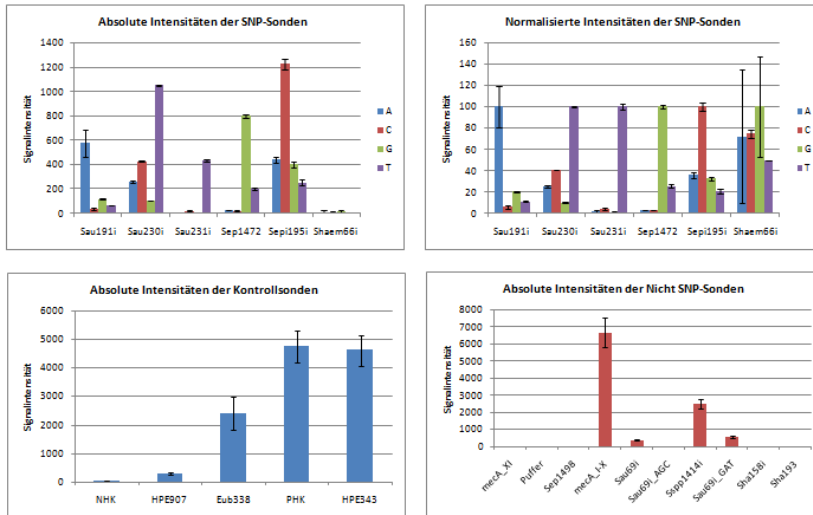


Abbildung 114: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03101)-Stamm, Slide 9 und Array 2.

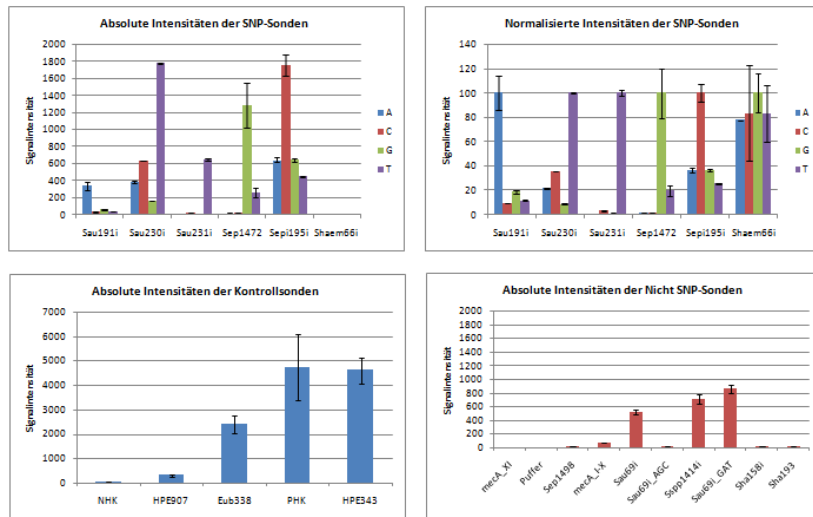


Abbildung 115: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03133)-Stamm, Slide 9 und Array 3.

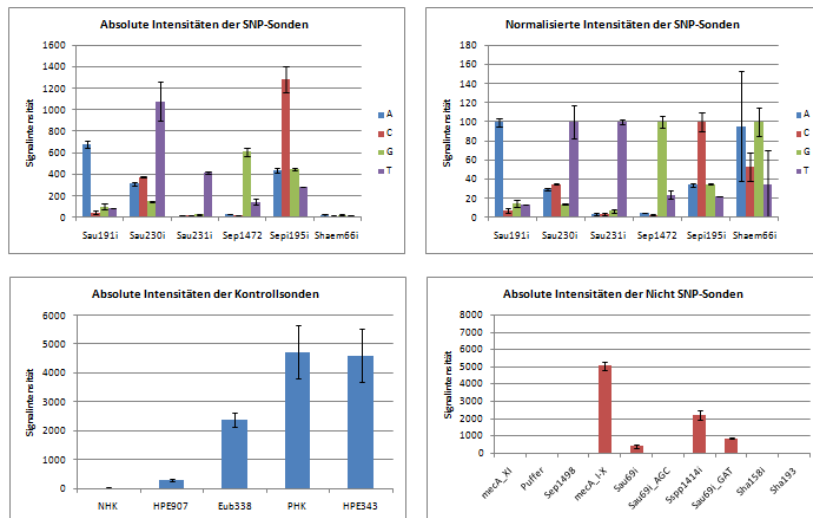


Abbildung 116: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03135)-Stamm, Slide 9 und Array 4.

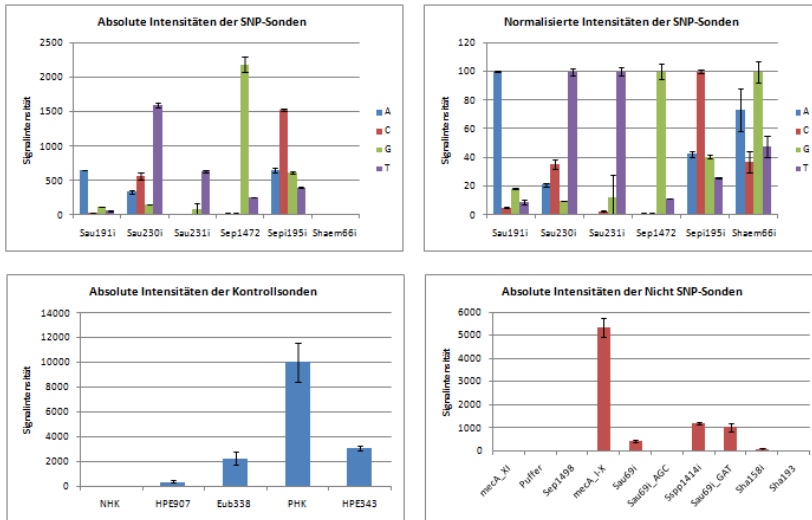


Abbildung 117: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03148)-Stamm, Slide 9 und Array 5.

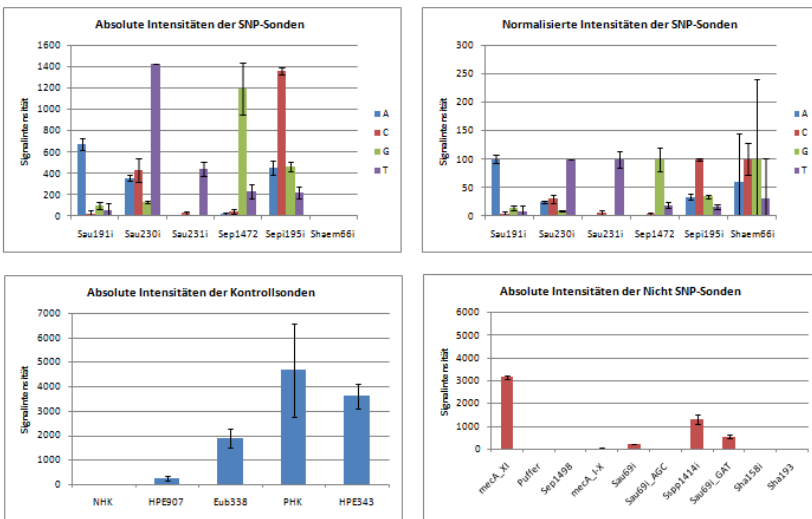


Abbildung 118: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03171)-Stamm, Slide 9 und Array 6.

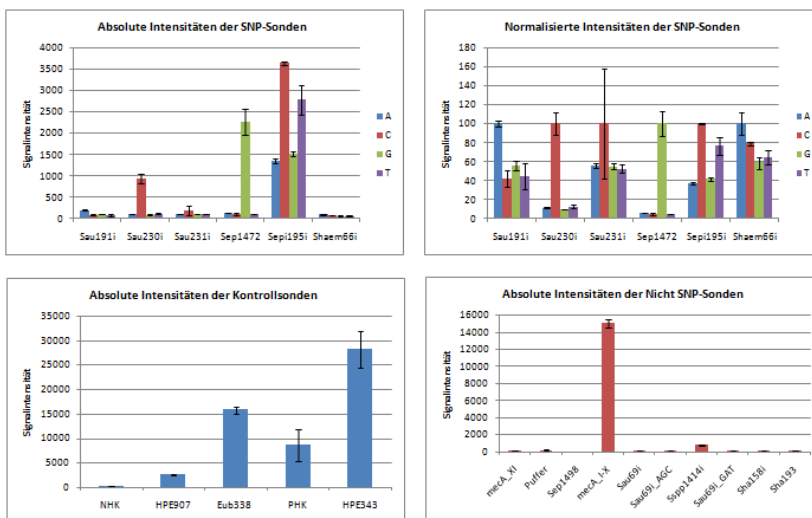


Abbildung 119: Sondensignale vom *S. pseudintermedius* (12-03185)-Stamm, Slide 9 und Array 7.

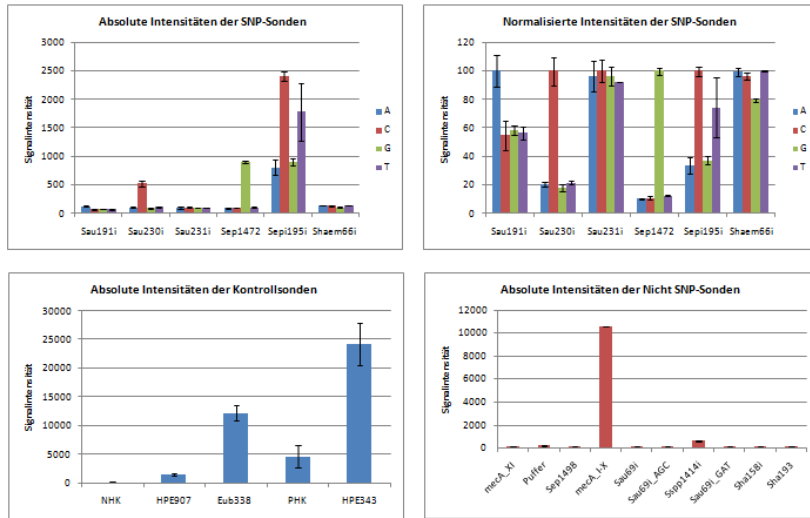


Abbildung 120: Sondensignale vom *S. pseudintermedius* (12-03205)-Stamm, Slide 9 und Array 8.

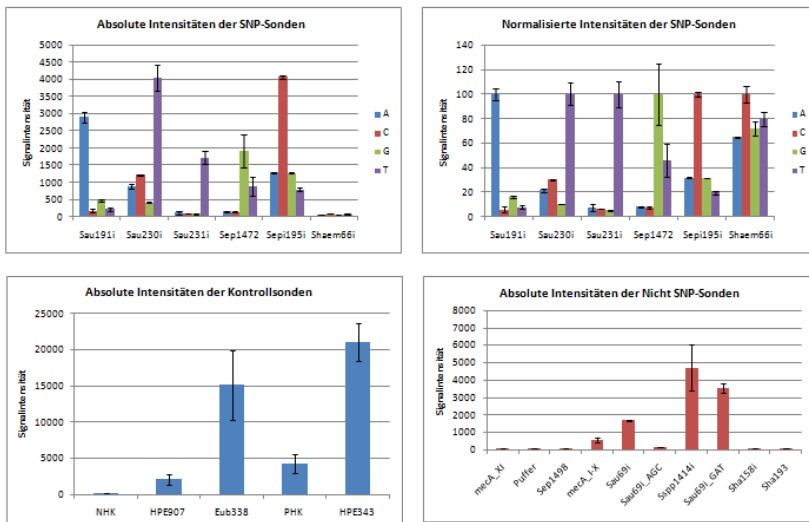


Abbildung 121: Sondensignale vom *S. aureus* (12-03208)-Stamm, Slide 9 und Array 9.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Bier dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit für eine Doktorarbeit am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie gab. Sein Vertrauen, dass er in mich gesetzt hat und seine ständige Unterstützung waren für mich wertvolle Begleiter, die mich in meiner Arbeit bestärkt haben.

Herrn Prof. Dr. Bereswill danke ich für die Bereitschaft mich in Rahmen dieser Dissertation zu betreuen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Harald Peter für alle Mühe und die tägliche Begleitung meiner Arbeit am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie danken.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Julia Wienke bedanken, die meine Fragen stets beantwortet hat und mir mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Des Weiteren bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Tadros für seine Hilfestellungen und seine motivierende Ermutigung, die mir stets geholfen haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe-Bier am Fraunhofer IZI-BB danke ich herzlich für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft und auch Unterstützung.

Ein wichtiger Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Schwestern und Brüdern, die an mich geglaubt haben und mich aus der Ferne immer wieder ermutigt und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der mich während dieser Arbeit nicht nur finanziell, sondern auch mit viel Liebe begleitet hat.

Abschließend gilt mein großer Dank meiner Mutter, die für mich immer die beste Freundin war und ist und stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und Sorgen hat.

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, [Zeinab G. Sheim], versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Nachweis und Charakterisierung von Antibiotika-resistenten Staphylokokken mittels Multiplex-PCR und DNA-Microarray] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

keine

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

