

Universität Bielefeld

Fakultät für Biologie  
Lehrstuhl für Genetik

**Abschlussbericht für das Landesamt für Natur, Umwelt und  
Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW)  
zu dem Forschungsvorhaben**

**Entwicklung und Evaluierung eines Resistenz-  
Microarrays für die Detektion  
von Resistenzdeterminanten  
in Bakterien aus Kläranlagen**

Bielefeld, Juni 2007



**Prof. Dr. A. Pühler**  
Fakultät für Biologie  
Lehrstuhl für Genetik

**Projektlaufzeit: 01.06.2006 bis 30.11.2006**

**Projektverantwortliche Personen:**

Prof. Dr. Alfred Pühler  
Lehrstuhl für Genetik  
Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld  
Universitätsstrasse 25  
33615 Bielefeld

Dr. Andreas Schlüter  
Lehrstuhl für Genetik  
Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld  
Universitätsstrasse 25  
33615 Bielefeld

Dr. Rafael Szczepanowski  
Lehrstuhl für Genetik  
Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld  
Universitätsstrasse 25  
33615 Bielefeld

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>3.</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	4
<b>4.</b>	<b>Auswahl von Resistenzgenen zur Herstellung von spezifischen Oligonukleotiden und Primern</b> .....	5
<b>5.</b>	<b>Entwicklung von Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotiden</b> .....	10
<b>6.</b>	<b>Primerentwicklung zur Herstellung der Hybridisierungssonden</b> .....	11
<b>7.</b>	<b>Isolierung von Gesamt-Plasmid-DNAs aus Belebtschlamm Bakterien zur Erzeugung von Resistenzgen-spezifischen Amplikons mittels PCR</b> .....	12
<b>8.</b>	<b>Nachweis der in Belebtschlamm Bakterien vorhandenen, Plasmid-lokalisierten Resistenzgene mittels PCR</b> .....	15
<b>9.</b>	<b>Hybridisierung von Multiplex-Sonden gegen Resistenzgen-spezifische Amplikons</b> .....	16
<b>10.</b>	<b>Layout und Fabrikation des Resistenz-Microarrays sowie Hybridisierung und Datenerfassung durch Fluoreszenzmessung</b> .....	17
<b>11.</b>	<b>Effizienztest des Resistenz-Microarrays</b> .....	20
<b>12.</b>	<b>Ausblick</b> .....	22
<b>13.</b>	<b>Literatur</b> .....	24
<b>14.</b>	<b>Anhang</b> .....	28
14.1	Abbildungen .....	28
14.2	Tabellen .....	31
14.3	Abkürzungsverzeichnis und Glossar .....	51

## 1. Zusammenfassung

Zur Detektion von Resistenzdeterminanten, die in Bakterien einer kommunalen Abwasserkläranlage vorkommen, wurde ein Resistenz-Microarray entwickelt. Insgesamt wurden 650 DNA-Sequenzen von Resistenzgenen aus verschiedenen Sequenzdatenbanken extrahiert. Multiple Alignments und phylogenetische Analysen haben zur Auswahl von 197 Genen für das Design und die Generierung von 70 Basen langen Oligonukleotiden geführt, die auf dem Array die Resistenzgene spezifisch repräsentieren sollen. Zusätzlich wurden 35 Oligonukleotide als Kontrollen eingesetzt. Zur Herstellung von Hybridisierungssonden wurden 200 Primerpaare entworfen, die das jeweilige Oligonukleotid flankieren. PCRs zum Test der Spezifität der 200 Primerpaare mit Gesamt-Plasmid-DNAs der Belebtschlamm-Bakterien als Template haben zu 146 PCR-Produkten geführt. Die Sequenzierung ausgewählter Amplikons hat deren Identität verifiziert. Die Hybridisierungssonden wurden in Multiplex-PCRs hergestellt. Erste Hybridisierungsversuche mit dem hergestellten Resistenz-Microarray haben gezeigt, dass ein Nachweis von Resistenzgenen in einem komplexen DNA-Gemisch möglich ist.

## 2. Einleitung

Der weit verbreitete Einsatz von Antibiotika bei der Behandlung von Infektionskrankheiten in der Human- und Tiermedizin verursachte ein vermehrtes Auftreten von Antibiotika-resistenten Bakterien. Zahlreiche Studien belegen, dass der Anteil resistenter Bakterien in Korrelation zum mengenmäßigen Einsatz des entsprechenden Antibiotikums über die Zeit ansteigt (Übersichtsartikel: (Baquero & Blázquez, 1997; Glynn *et al.*, 1998; Livermore, 2000; Mazel & Davies, 1999). Besorgniserregend ist z.B. das Auftreten Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA), Vancomycin-resistenter *Enterococcus* Stämme (VRE), Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae* Stämme und multiresistenter Enterobakterien und *Pseudomonas aeruginosa* Stämme in Kliniken. Teilweise stehen keine Antibiotika zur Verfügung, die für die Behandlung von Infektionen, die durch diese Bakterien hervorgerufen werden, eingesetzt werden können. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, welche Mechanismen für die schnelle Verbreitung von Resistenzdeterminanten eine Rolle spielen und wie es zur Entstehung multiresistenter Bakterienstämme kommen kann. Resistenz kann prinzipiell durch Punktmutation vorhandener Gene oder durch die Aufnahme neuer genetischer Information entstehen. Die laterale Aufnahme von Resistenzdeterminanten, auch als horizontaler Transfer (HT) bezeichnet, kann prinzipiell über Phagen-vermittelte Transduktion, über Aufnahme nackter DNA aus dem Medium (Transformation) oder über

Konjugation bakterieller Zellen erfolgen (Davison, 1999). Horizontaler Gentransfer (HGT) ist für die Anpassungsfähigkeit bakterieller Gemeinschaften an variable Umweltbedingungen und für die Evolution der Bakterien von zentraler Bedeutung. Durch HGT können außer Resistenzen gegen Antibiotika, auch Schwermetallresistenzen, degradative Eigenschaften oder andere phänotypische Merkmale erworben werden, die unter bestimmten Umweltbedingungen einen selektiven Vorteil vermitteln, der das Überleben sichert und das Wachstum verbessern kann. Für die Verbreitung von Resistenzdeterminanten ist wohl der horizontale Transfer mit Hilfe mobiler genetischer Elemente (MGE), insbesondere konjugativer Plasmide der wichtigste Mechanismus (Davies, 1994; Davies & Wright, 1997; Mazel & Davies, 1999; Olsen, 1999; Seveno *et al.*, 2002; Tschäpe, 1994). Plasmide sind meistens zirkuläre Erbspeicher-Moleküle, die weitgehend selbstständig neben dem Haupterbspeicher, dem bakteriellen Chromosom, in Bakterien vorhanden sein können. Sie werden zu den mobilen genetischen Elementen gezählt, da sie auf andere Bakterien der gleichen Art oder fremder Arten übertragen werden können. Man unterscheidet selbsttransmissible Plasmide, die die genetische Information für ihre Transferierbarkeit tragen, und mobilisierbare Plasmide, die für ihren Transfer ein Helferplasmid benötigen.

Neben den Plasmiden spielen auch andere mobile genetische Elemente (MGE) wie z.B. Insertionssequenzen (IS), Transposons (Tn) und Integrons (In) bzw. Integron-spezifische Genkassetten eine wichtige Rolle für die Verbreitung genetischer Information (Bennett, 1999; Bennett, 2004; Collis & Hall, 1995; Gomez-Lus, 1998; Hall & Collis, 1995; Osborn & Boltner, 2002; Rowe-Magnus & Mazel, 1999; Smalla & Sobecky, 2002; Sundström, 1998). Die genannten Elemente bewerkstelligen die Translokation genetischer Marker innerhalb einer Replikationseinheit oder von einer Replikationseinheit auf ein anderes Replikon über den Mechanismus der Transposition bzw. der ortsspezifischen Rekombination. IS-Elemente, Transposons und Integrons befinden sich häufig auf Plasmiden und können mit Resistenzdeterminanten assoziiert sein. Damit gibt es in der Natur genetische Elemente, die den DNA-Transfer zwischen Replikons innerhalb einer Bakterienzelle und zwischen Zellen über Artgrenzen hinweg vermitteln können.

Im weiteren stellt sich die Frage an welchen Orten bevorzugt genetische Information transferiert wird. In diesem Zusammenhang sind Habitats zu nennen, die sich durch eine hohe mikrobielle Dichte und hohe Stoffwechselaktivitäten auszeichnen (Dröge *et al.*, 1998; Dröge *et al.*, 1999). Diese Eigenschaften treffen insbesondere auf Abwässer und Klärschlämme in Abwasserkläranlagen zu. Abwasser, das in kommunale Kläranlagen gelangt, setzt sich aus dem verunreinigten Wasser der privaten Haushalte, der Krankenhäuser, der Industrie und der

Agrarwirtschaft zusammen. Der Einsatz von Antibiotika zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken und als Futtermittelzusatz in der Masttierhaltung führt zur Selektion von antibiotikaresistenten Bakterien, die zusammen mit nicht metabolisierten Antibiotika im Abwasser die Kläranlage erreichen. Diverse Studien konnten sowohl Antibiotika als auch antibiotikaresistente Keime in Abwässern aus privaten Haushalten und Krankenhäusern nachweisen (Feuerpfeil *et al.*, 1999; Guardabassi *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999; Kümmerer, 2001; Kümmerer *et al.*, 2000; Witte, 1998). So wurden z.B. die Antibiotika Ciprofloxacin und Ampicillin im Abwasser deutscher Krankenhäuser nachgewiesen (Hartmann *et al.*, 1998; Kümmerer, 2001). Fontaine und Hoadley (1976) beschreiben das Vorkommen multiresistenter coliformer Bakterien in kommunalen und Krankenhaus-Abwässern. Einige der in dieser Studie nachgewiesenen Resistenzen waren auf *Escherichia coli* und *Salmonella* Rezipienten-Stämme übertragbar. Zahlreiche andere Studien beschreiben die Isolierung von mobilen genetischen Elementen, insbesondere von Plasmiden aus Abwässern und Belebtschlamm (Blázquez *et al.*, 1996; Dröge *et al.*, 2000; Heuer *et al.*, 2002; Mach & Grimes, 1982; Smalla & Sobecky, 2002; Top *et al.*, 1994; van Overbeek *et al.*, 2002).

In Kläranlagen kann es zur Verbreitung von genetischem Material durch horizontalen Gentransfer, insbesondere bakterielle Konjugation, kommen (Feuerpfeil *et al.*, 1999). Transfer von genetischem Material konnte bereits im Belebtschlamm von Kläranlagen (Marcinek *et al.*, 1998) gezeigt werden. Konjugation im Belebtschlamm der Abwasserkläranlagen ist von besonderem Interesse für die Verbreitung von Resistenzdeterminanten. Resistente Bakterien, die in die Kläranlage eingeleitet werden, finden im Belebtschlamm Bedingungen vor, die für einen DNA-Transfer förderlich sind. So begünstigen gute Nähr- und Sauerstoffkonzentrationen die Vermehrung von Bakterien, was zu hohen Zelldichten ( $10^9$  Bakterien pro ml Belebtschlamm) führt (Geisenberger *et al.*, 1999; Snaird *et al.*, 1997). Außerdem kann die Präsenz von Belebtschlammflocken, Partikel, die hauptsächlich aus organischer Biomasse bestehen, die Konjugation an festen Oberflächen begünstigen. Diverse Studien konnten den konjugativen Transfer von Resistenzdeterminanten im Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen (Geisenberger *et al.*, 1999; Marcinek *et al.*, 1998) und einer Laboranlage (Nüsslein *et al.*, 1992) feststellen.

Nach den Reinigungsprozessen in der Kläranlage wird das Wasser über den Vorfluter in der Regel in ein Fließgewässer eingeleitet. Das gereinigte Abwasser enthält etwa nur noch 0.1 % der Bakterien, die im Zulauf der Kläranlage nachweisbar waren. Dennoch kommt es somit unter Berücksichtigung der verarbeiteten Abwassermengen zu einer beträchtlichen

Freisetzung von Mikroorganismen in die Umwelt, unter denen sich auch pathogene und Antibiotika-resistente Vertreter befinden können. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass aus Kläranlagen stammende Bakterien über die Nahrungskette ihren Weg zurück zum Menschen finden. Somit ergibt sich ein Gefährdungspotential im Hinblick auf die menschliche Gesundheit, insbesondere auch unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass in der Kläranlage durch Neukombination von genetischem Material Organismen mit veränderten Resistenz- bzw. Pathogenitätseigenschaften entstehen können.

### 3. Aufgabenstellung

Das Projekt hatte die Entwicklung und Evaluierung eines Resistenz-Microarrays zum Ziel. Dieser soll zur Detektion von Plasmid- und Chromosom-lokalisierten Resistenzdeterminanten von Bakterien unterschiedlicher Kompartimente einer kommunalen Abwasserkläranlage dienen. Die Abbildung 1 stellt die experimentelle Vorgehensweise vor.

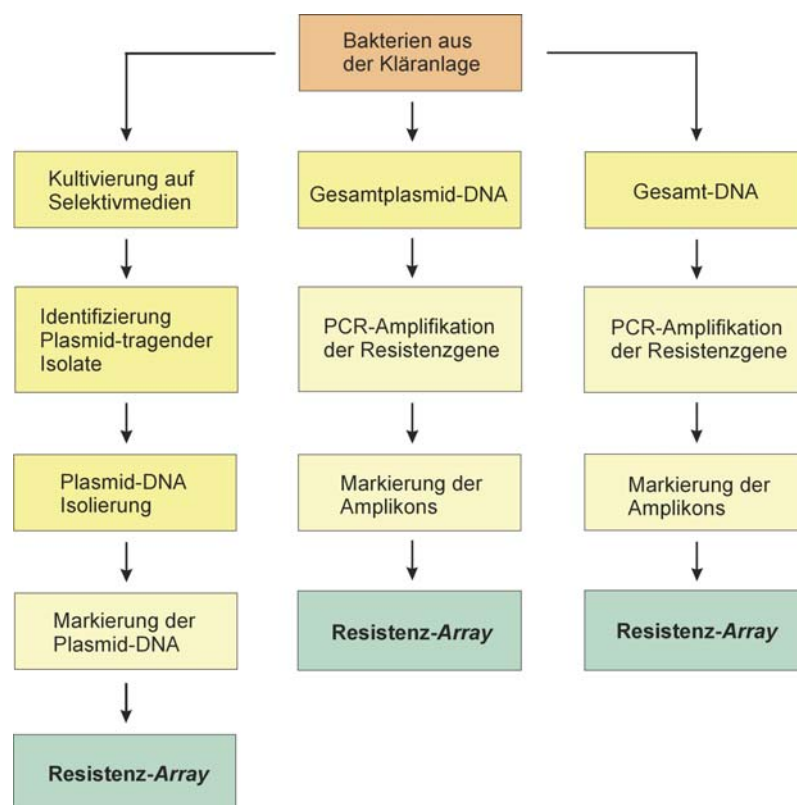


Abbildung 1: Fließschema des Projekts

Es war vorgesehen, drei unterschiedliche Arten von Sonden zur Hybridisierung gegen den Resistenz-Microarray herzustellen. Die linke Spalte der Abb. 1 zeigt die Herstellung von Sonden unter Verwendung einzelner Plasmide, die aus Kläranlagen-Bakterien isoliert wurden. Die mittlere Spalte beschreibt die Herstellung einer Sonde, die von isolierter Gesamtplasmid-

DNA ausgeht. Die dritte Sonde (rechte Spalte der Abbildung 1) kann mit einer Gesamt-DNA, die aus Kläranlagen-Bakterien isoliert wird, als Ausgangsmaterial hergestellt werden. Die letzten beiden Sonden können durch den Einsatz der PCR hergestellt werden.

Im ersten Teil des Projekts sollten zur Fabrikation des Microarrays Resistenzgene ausgewählt und dazugehörige Resistenzgen-spezifische Oligonukleotide generiert werden. Es folgt die Herstellung des Arrays. Anschließend wird das Resistenz-Microarray durch Hybridisierung gegen die Resistenzgene getestet, die sich auf den am Lehrstuhl für Genetik sequenzierten Plasmiden aus Bakterien des Belebtschlamm befinden.

#### 4. Auswahl von Resistenzgenen zur Herstellung von spezifischen Oligonukleotiden und Primern

Für das Design der Oligonukleotide, die spezifisch für Resistenzdeterminanten sind, wurden Antibiotika-Resistenzgene ausgewählt, die gegen Aminoglykoside,  $\beta$ -Laktame, Chloramphenicol, Macrolide, Methicillin, Quinolone und Fluoroquinolone, Rifampicin, Tetracycline, Trimethoprim und Sulfonamide sowie quaternäre Ammoniumverbindungen Resistenz vermitteln. Die Wirkung der Antibiotika dieser Klassen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ausgewählte Antibiotikaklassen und deren Wirkung

<b>Antibiotikaklasse</b>	<b>Wirkung</b>
Quinolone / Fluoroquinolone	Replikation
Rifampicin	Transkription
Aminoglykoside	Proteinbiosynthese
Chloramphenicol	Proteinbiosynthese
Makrolide	Proteinbiosynthese
Tetracycline	Proteinbiosynthese
Trimethoprim, Sulfonamide	Folsäuresynthese
$\beta$ -Laktame, Methicillin	Zellwandsynthese
Quaternäre Ammoniumverbindungen	Zellmembran-Dissoziation, Enzyminaktivierung

Die Suche nach Resistenzgenen in bakteriellen Populationen aus Kläranlagen führte zunächst zu Resistenzplasmiden, die aus Bakterien des Belebtschlamm und des Vorfluters kommunaler Abwasserkläranlagen isoliert und an der Universität Bielefeld sequenziert und charakterisiert wurden. Es handelt sich um die IncP-1 Resistenzplasmide pB2/3 (Heuer *et al.*, 2004), pB4 (Tauch *et al.*, 2003), pB8 (Schlüter *et al.*, 2005), pB10 (Schlüter *et al.*, 2003), pTB11 (Tennstedt *et al.*, 2005) und pRSB111 (Szczepanowski *et al.*, 2007) sowie um die Erythromycin-Resistenzplasmide pRSB101 (Szczepanowski *et al.*, 2004), pRSB105 (Schlüter *et al.*, 2007), und pRSB107 (Szczepanowski *et al.*, 2005) und um das Quinolone-Resistenzplasmid pGNB2 (Bönemann *et al.*, 2006). Die Abbildungen der genannten Plasmide



sind im Anhang (Abbildung A1 und A2) vorzufinden. Zusätzlich konnten Klasse 1 Integron-spezifische Sequenzen, die aus Belebtschlamm- und Vorfluterbakterien einer kommunalen Abwasserkläranlage isoliert und molekulargenetisch charakterisiert wurden (Tennstedt *et al.*, 2003), in die Suche einbezogen werden. Die Integron-spezifischen Sequenzen sind im Anhang in der Abbildung A3 dargestellt. Auf diese Weise konnten folgende Resistenzgene ausgewählt werden:

- Plasmid pB3: *tet(A)*, *sull*, *cmlA1*, *bla<sub>NPS-2</sub>*
- Plasmid pB4: *mexD*, *bla<sub>NPS-1</sub>*
- Plasmid pB8: *qacF*, *oxa-2*
- Plasmid pB10: *tet(A)*, *strA*, *strB*
- Plasmid pRSB111: *mph(B)*
- Plasmid pTB11: *aacA4*, *aadA1*, *aphA*
- pRSB101: *bla<sub>TLA-2</sub>*, *dhfr1*, *mph(A)*, *orf11*, *qacEΔ1*
- pRSB105: *mph*, *mel*
- pRSB107: *aph*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *catA*, *dhfR*, *sullI*, *tetA(C)*
- pGNB2: *qnrS-2*
- Integron-spezifische Resistenzgenkassetten: *dfrII*, *dfrV*, *dfrVII*, *dfrXII*, *dfr17*, *dfrB2*, *aadB*, *aacA29b*, *aacC1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA8*, *qacF*, *qacH*, *cmlA5*, *catB2*, *oxa*, *oxa-1*, *oxa-10*

Für die Suche nach weiteren Resistenzgenen wurden verschiedene Datenbanken (SRS@EBI, NCBI) sowie Internetadressen von Kliniken und Universitäten (<http://www.lahey.org/Studies/> und <http://faculty.washington.edu/marilynr/>) durchsucht.

Das Ergebnis dieser Suche waren insgesamt ca. 650 Resistenzgensequenzen, die durch multiple Alignments auf ihre Eignung für die Erstellung von spezifischen Oligonukleotiden untersucht wurden.

Die multiplen Alignments wurden mit dem Programm ClustalX jeweils für eine Resistenzgenkategorie durchgeführt (z.B. alle Gene für Chloramphenicol-Acetyltransferasen getrennt von Genen für Chloramphenicol-Exportern). Der Ausschnitt eines multiplen Alignments ist in Abbildung 2 dargestellt.

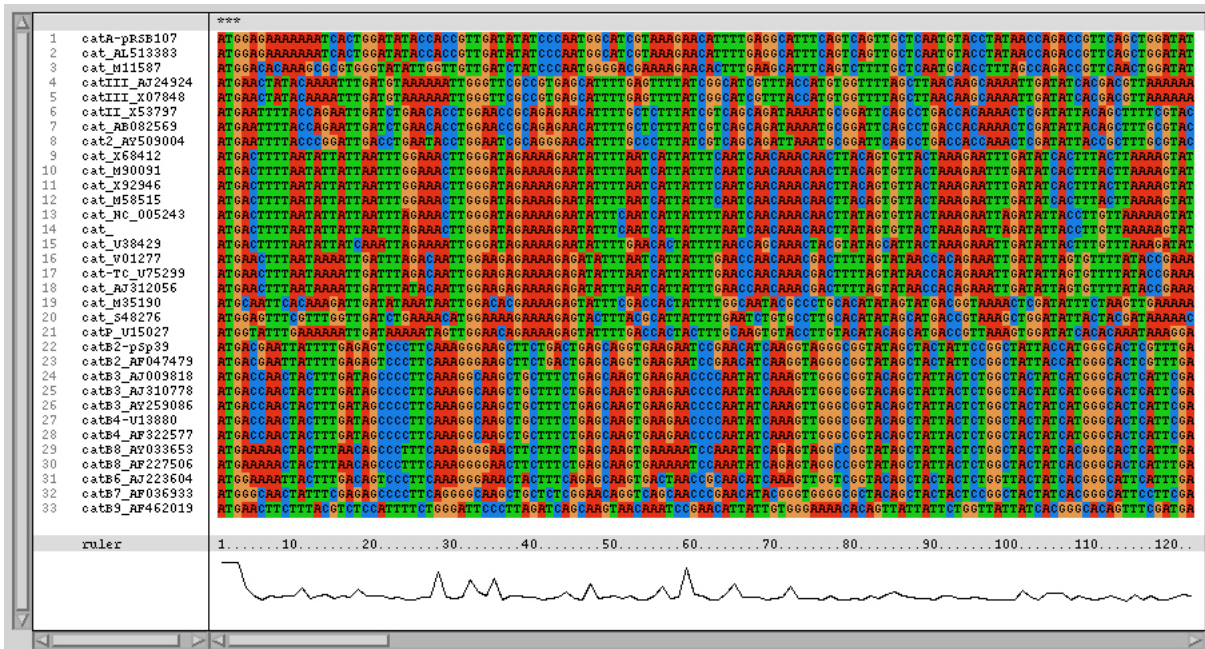


Abbildung 2: Ausschnitt eines multiplen Alignments von Chloramphenicol-Acetyltransferase Genen generiert mit ClustalX (Jeanmougin *et al.*, 1998).

Die multiplen Alignments dienen der Überprüfung der Ähnlichkeit von Sequenzen und dem Auffinden von konservierten und Gen-spezifischen Regionen innerhalb der jeweiligen Genklassen. Zur übersichtlicheren Visualisierung wurden aus den multiplen Alignments phylogenetische Bäume (mit der *Neighbour-joining* Methode und einem Bootstrap-Wert von 1000) erstellt. Ein Beispiel für eine solche Darstellung ist in Abbildung 3 gezeigt.

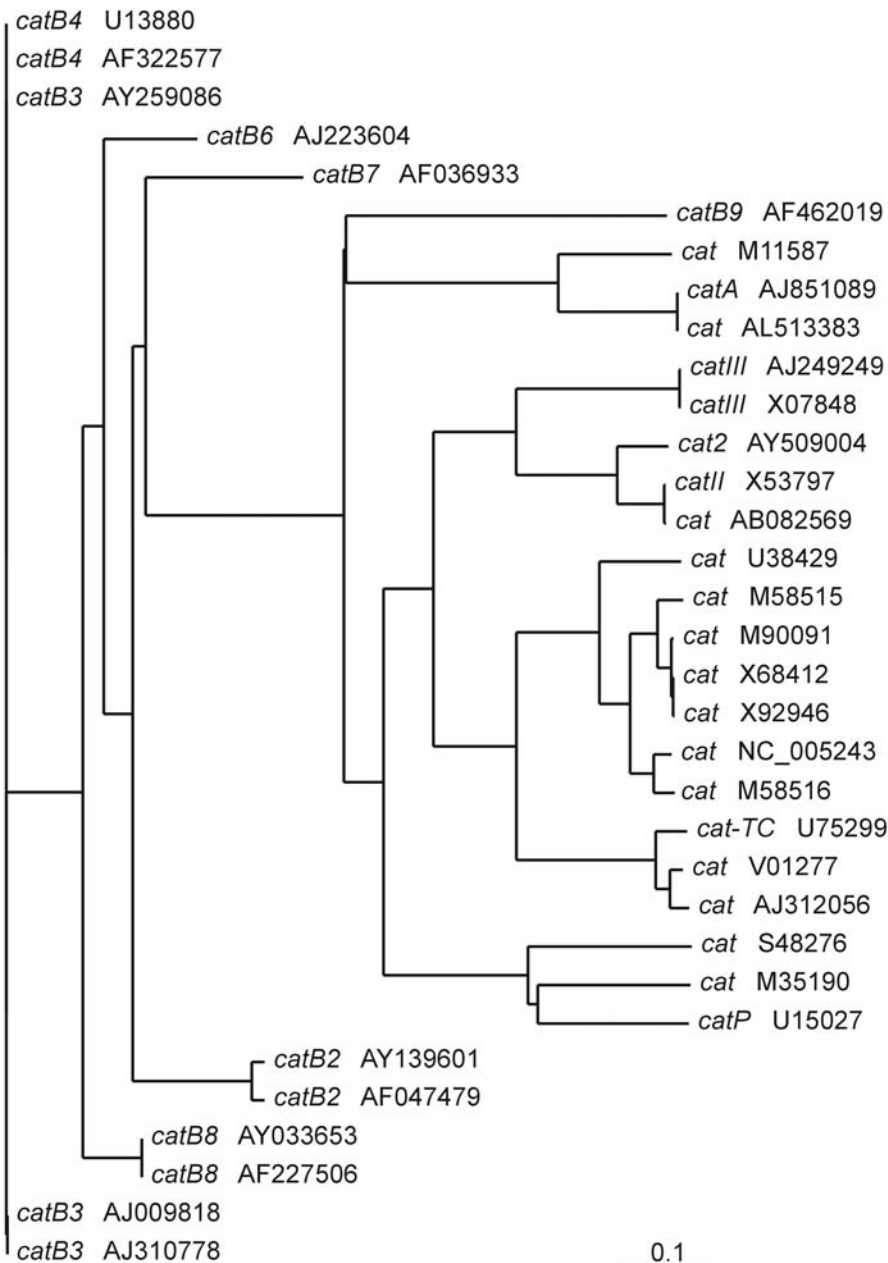


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum von Genen, die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodieren. Der Baum wurde aus einem in ClustalX (Jeanmougin *et al.*, 1998) generierten Alignment mit der *Neighbour-joining* Methode (Bootstrap-Wert von 1000) und mittels TreeView (Page, 1996) visualisiert. Die Länge des Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von zehn Basen pro 100 Basen.

Mit Hilfe des phylogenetischen Baums kann die Verwandtschaft und die Ähnlichkeit von Genen graphisch veranschaulicht werden. Dazu wird die Distanz, die ein Maß für Ähnlichkeit ist, zwischen Genen betrachtet. Unter Verwendung des Maßstabs, in diesem Fall entspricht die Länge des Balkens einem Unterschied in der DNA-Sequenz von zehn Basen pro 100 Basen, kann so eine Aussage über die Ähnlichkeit von Genen getroffen werden. Werden z. B. die Gene *catB8* (AY033653) und *catB8* (AF227506) betrachtet so fällt auf, dass sie sehr ähnlich sein müssen. Tatsächlich sind diese Gene identisch. Auf der anderen Seite müssten

sich die Gene *cat* (M35190) und *catP* (U15027) deutlich unterschieden. Dies ist auch der Fall. Zwischen den Genen besteht nur eine 67 %ige Ähnlichkeit.

Innerhalb eines Baums wurden nahe verwandte Gene nochmals einem multiplen Alignment unterzogen (siehe Abbildung 4A). Für das Oligo-Design wurden dann nur die Gene ausgewählt, die sich in mindestens 5 % ihrer DNA-Sequenz unterschieden haben (siehe Abbildung 4B).

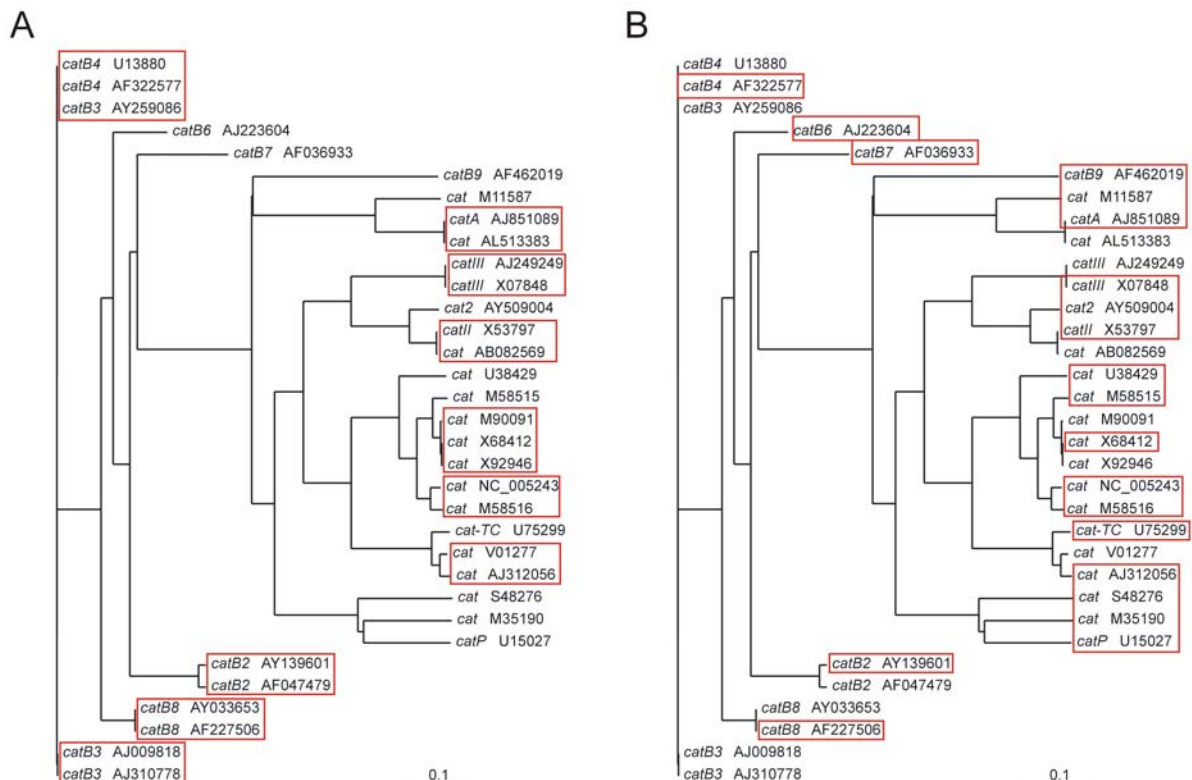


Abbildung 4: Auswahl von Resistenzgenen für das Design von spezifischen Oligonukleotiden. Abbildung 4A zeigt die Bildung von Gruppen für zusätzliche multiple Alignments (Rote Kästen) innerhalb einer Klasse von Genen. Abbildung 4B zeigt die ausgewählten Gene für das Design von Oligonukleotiden. Die Länge des Balkens entspricht einem Sequenzunterschied von zehn Basen pro 100 Basen.

Diese Vorgehensweise ermöglichte die Auswahl von 248 Resistenzgenen für das Design von Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotiden. Die Verteilung der Anzahl der Resistenzgene auf verschiedene Antibiotikaklassen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zahl der Resistenzgene, die für das Design spezifischer Oligonukleotide ausgewählt wurden.

<b>Antibiotikaklasse</b>	<b>Anzahl der ausgewählten Resistenzgene</b>
Quinolone / Fluoroquinolone	8
Rifampicin	1
Aminoglykoside	37
Chloramphenicol	30
Makrolide	28
Tetracycline	40
Trimethoprim & Sulfonamide	22
β-Laktame	62
Methicillin	1
Multidrug-Transporter	10
Quaternäre Ammoniumverbindungen	9
Summe	248

Zusätzlich wurden sechs weitere Gene, die spezifisch für Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen (Inc) IncP, -Q, -W, -N, -A/C, und -F sind, für das Design von Oligonukleotiden ausgewählt. Zu den Inc-Gruppen P, Q, W, N, A/C gehören selbst-transmissible Plasmide, während zur IncF-Gruppe Plasmide aus Enterobakterien (Darmbakterien; z.B. *Escherichia coli*) gehören. Des Weiteren wurden die Gene *gfp* (Gen aus der Qualle *Aequorea victoria*, das für ein grün fluoreszierendes Protein kodiert) und *luc* (Gen aus dem Leuchtkäfer *Photuris pennsylvanica*, das für die Luziferase kodiert), die nicht in Kläranlagenbakterien vorkommen sollten als negative Kontrollen ausgewählt.

## 5. Entwicklung von Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotiden

Mit Hilfe des Programms Oligo Designer (Burkhard Linke, BRF, Universität Bielefeld) wurden Gen-spezifische Oligonukleotide für insgesamt 248 Resistenzgene und acht Kontrollgene berechnet. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 3 dargestellt:

Tabelle 3: Definierte Parameter für das Design der Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotide durch das Programm Oligo Designer.

Länge	70mere
Schmelztemperatur	Minimum: 75 °C; Optimum: 78 °C; Maximum: 81 °C
Salzkonzentration	0,1 M
Stemsize <sup>1</sup>	Maximal 8 Basen
Standard QGramMatch <sup>2</sup>	Q=8/14-18 Nukleotide/ 70 %
Ausschluss <sup>3</sup>	Jeweils 50 Basen vom 5'- und 3'-Ende

<sup>1</sup> Stemsize – gibt die maximale Zahl der Basenpaarungen in einer Sekundärstruktur innerhalb eines Oligos an

<sup>2</sup> Standard QGramMatch – Überprüfung der Einzigartigkeit der Oligos. Scan nach 8 bp langem Bereich von Identität zu anderen Genen und dessen Ausweitung auf 14-18 bp oder Scan nach 70 % Homologie über die gesamte Länge des Oligos.

<sup>3</sup> Ausschuss – notwendig für das Design von spezifischen Primern

Aufgrund einer zu hohen Ähnlichkeit mancher Gene zueinander konnten keine spezifischen Oligonukleotide vorgeschlagen werden. Deswegen wurden insgesamt 79 Gene zu 35 Gruppen zusammengefasst und für diese Gruppen konnten spezifische Oligonukleotide generiert werden. Insgesamt wurden 232 spezifische Oligonukleotide entworfen (197 Resistenzgene, 35 Kontrollen) und generiert (Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland). Die Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Verteilung der Oligonukleotide auf die Schmelztemperaturen. Die Oligonukleotide und deren Spezifikationen sind in Tabelle A1 im Anhang zu sehen.

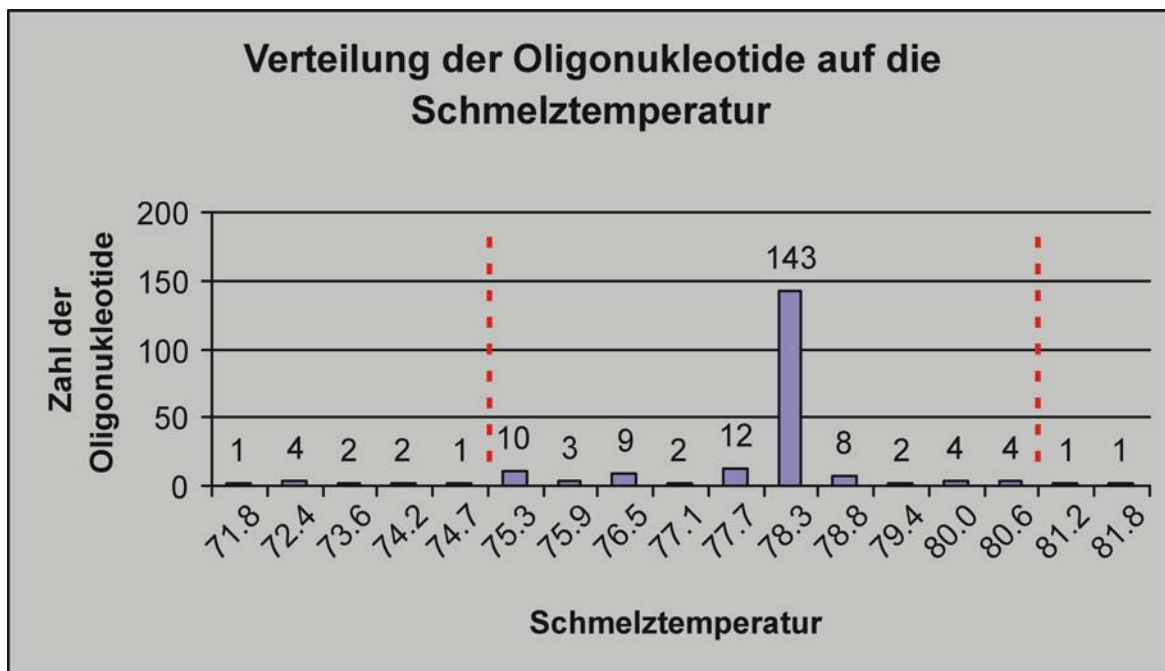


Abbildung 5: Zahl der Oligonukleotide mit bestimmten Schmelztemperaturen. Die optimale Schmelztemperatur wurde auf 78 °C gesetzt, die minimale auf 75 °C und die maximale auf 81 °C. Der Bereich zwischen den roten Strichen stellt die Zahl der Oligonukleotide dar, die in den oben angegebenen Temperaturbereich passen.

## 6. Primerentwicklung zur Herstellung der Hybridisierungssonden

Zur Herstellung der Sonden, die gegen das Resistenzarray hybridisiert werden, werden Primer benötigt. Diese erlauben die Amplifikation von ausgewählten Bereichen (die durch die Oligonukleotide repräsentiert werden) der Resistenzgene, bei deren gleichzeitiger Markierung. Die Primer sind durch das Programm Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) generiert worden. Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Definierte Parameter für das Design der Primer für die Amplifikation von ausgewählten Resistenzbereichen, die durch die Oligonukleotide repräsentiert werden.

Länge	Minimum: 18 Basen Optimum: 20 Basen Maximum: 23 Basen
Schmelztemperatur	Minimum: 55 °C Optimum: 60 °C Maximum: 63 °C
Amplikon-Länge	Zwischen 130 und 200 Basen
Minimaler Abstand zum Oligonukleotid	Zwischen 0 und 10 Basen

Insgesamt wurden 200 Primerpaare generiert, mit deren Hilfe Resistenzgen-spezifische Amplikons erzeugt werden können (siehe Tabelle A2 im Anhang). Die theoretischen Längen der Amplikons und die Häufigkeit der Längen sind in Abbildung 6 dargestellt.

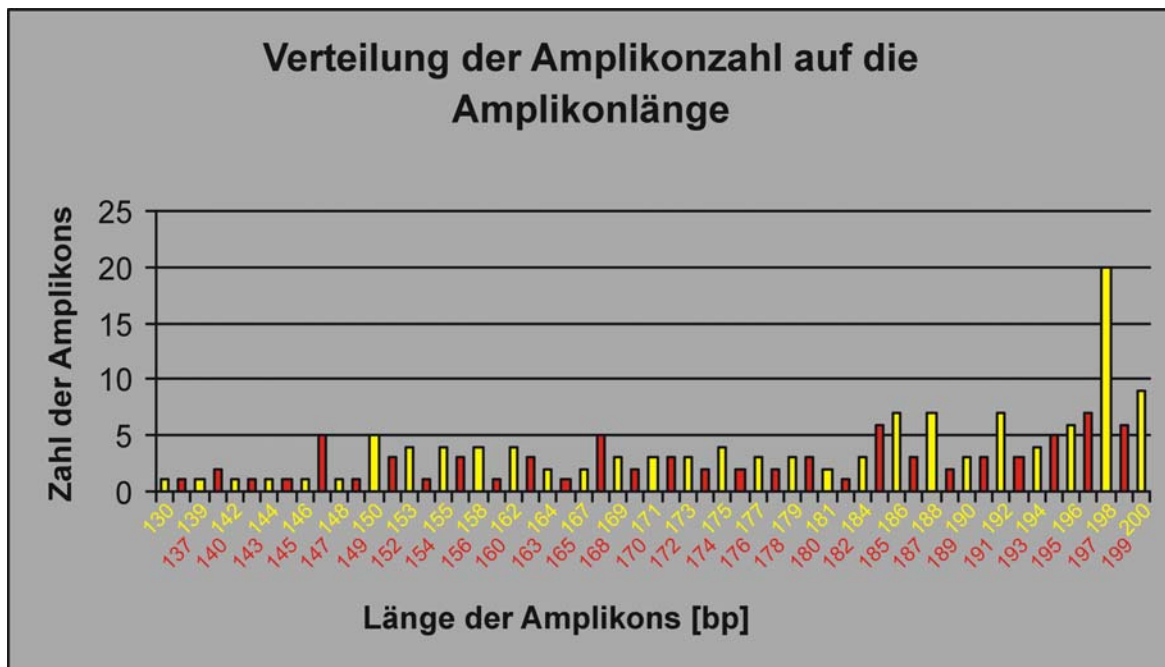


Abbildung 6: Zahl der Amplikons bestimmter Längen, die bei der Sondenherstellung entstehen.

## 7. Isolierung von Gesamt-Plasmid-DNAs aus Belebtschlamm-Bakterien zur Erzeugung von Resistenzgen-spezifischen Amplikons mittels PCR

Zum Nachweis von Plasmid-lokalisierten Resistenzgenen in Bakterien einer kommunalen Abwasserkläranlage wird die Gesamt-Plasmid-DNA aus diesem Habitat benötigt. Zum Zweck der Plasmidisolierung wurden im August und September 2006 Proben des Belebtschlammes der Kläranlage Bielefeld-Heepen entnommen. Die Proben wurden auf Festagarmedien ausgebracht, die unterschiedliche Antibiotika enthielten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Antibiotika und deren Konzentrationen, die zur Selektion von Belebtschlamm Bakterien eingesetzt wurden.

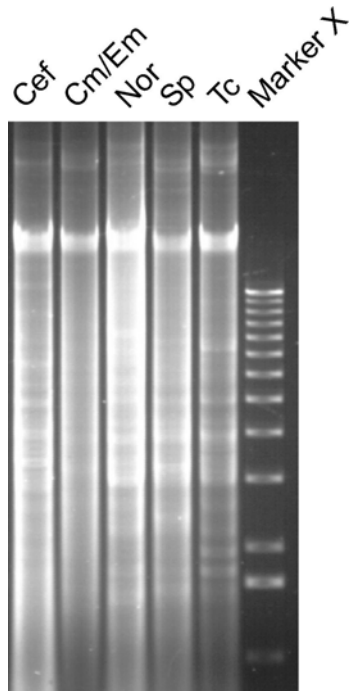
<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration [<math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>]</b>
Gentamicin	15
Kanamycin	50
Spectinomycin	100
Streptomycin	100
Ampicillin	100
Cefotaxim	1
Cefuroxim	15
Chloramphenicol	25
Ciprofloxacin	1
Norfloxacin	1
Erythromycin	200
Rifampicin	30
Tetracyclin	5

Das Medium enthielt zusätzlich Cycloheximid ( $75 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), um das Pilzwachstum zu minimieren.

Nach der Inkubation der Proben (36h bei  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurden die gewachsenen Bakterien abgeschwemmt und einer alkalischen Lyse mit anschließender Anionentauscher-Chromatographie (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) unterzogen (siehe Abbildung 7A). Diese Gesamt-Plasmid-DNA wurde im nächsten Schritt mittels einer Cäsiumchlorid Dichtegradientenzentrifugation von der chromosomalen DNA getrennt (siehe Abbildung 7B). Es ist deutlich zu erkennen, dass der chromosomale Anteil der DNA (der weiße Schmier in Abbildung 7A) nach der Dichtegradientenzentrifugation von der Plasmid-DNA (einzelne Banden in Abbildung 7B) getrennt wurde.



A



B

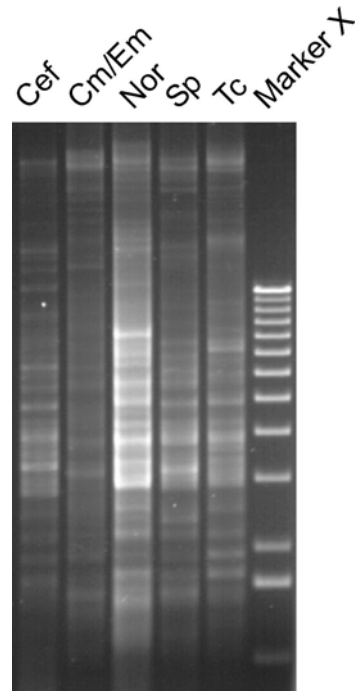


Abbildung 7: Die Überprüfung der Qualität von Gesamt-Plasmid-DNAs nach Isolierung mittels alkalischer Lyse (A) und nach einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation (B) in einem Agarosegel.

Abkürzungen: Cef – Cefuroxim; Cm – Chloramphenicol; Em – Erythromycin; Nor – Norfloxacin; Sp – Spectinomycin; Tc – Tetracyclin.

Die Konzentrationen der isolierten Gesamt-Plasmid-DNAs können der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Konzentration der isolierten Gesamt-Plasmid-DNAs.

<b>Primärselektion der Bakterien auf</b>	<b>DNA-Konzentration [ng / <math>\mu</math>l]</b>
Ampicillin	47,15
Cefotaxim	72,07
Cefuroxim	78,86
Ciprofloxacin	128,61
Erythromycin	41,83
Erythromycin + Rifampicin *	41,21
Gentamicin	16,37
Kanamycin	119,40
Norfloxacin	16,51
Spectinomycin	101,49
Streptomycin	116,78
Tetracyclin	22,64

\* Die auf Erythromycin bzw. Rifampicin gewachsenen Kulturen wurden aufgrund der geringen Zahl wachsender Bakterienkolonien für die Isolierung der Gesamt-Plasmid-DNA vereinigt.

Anschließend wurden jeweils 20 $\mu$ l der Gesamt-Plasmid-DNAs zu einer Master-Gesamt-Plasmid-DNA vereinigt (Endkonzentration: 79,87 ng /  $\mu$ l).

## 8. Nachweis der in Belebtschlamm-Bakterien vorhandenen, Plasmid-lokalisierten Resistenzgene mittels PCR

Zur Überprüfung des Vorkommens von Resistenzgenen auf Plasmiden der Belebtschlamm-Bakterien und der Funktionalität und Spezifität der Resistenzgen-spezifischen Primer wurden PCRs durchgeführt. Als *Template* diente dabei eine Mischung aus Gesamt-Plasmid-DNAs, die aus Belebtschlamm-Bakterien isoliert wurden, die wiederum mit den Antibiotika Ampicillin, Cefotaxim, Cefuroxim, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Erythromycin, Erythromycin / Rifampicin, Gentamicin, Kanamycin, Norfloxacin, Streptomycin, Spectinomycin und Tetracyclin selektioniert wurden (Master-Gesamt-Plasmid-DNA aus Punkt 5.).

Als Ergebnis der durchgeführten 200 PCR-Reaktionen sind 146 positive Signale mit der zu erwartenden Größe festzuhalten (siehe Tabelle A3). Dabei handelt es sich um 24 Aminoglykosid-, 31  $\beta$ -Laktam-, 17 Chloramphenicol-, vier Fluoroquinolon-, 14 Makrolid-, ein Rifampicin-, 21 Tetracyclin-, 14 Trimethoprim und Sulfonamid-Resistenzgene, fünf Resistenzgene gegen quaternäre Ammoniumverbindungen, neun Gene für Multidrug-Efflux Transporter, fünf Plasmid-spezifische Gene sowie um ein Tetracyclin Repressorgen. Das Ergebnis einer solchen PCR ist exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt.

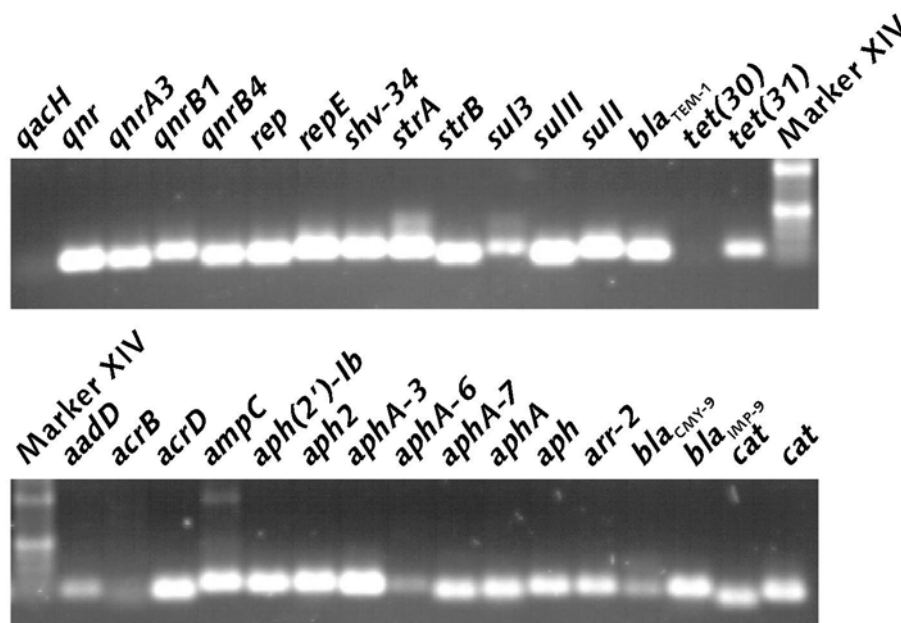


Abbildung 8: Nachweis von Resistenzgenen in Belebtschlamm-Bakterien mittels PCR. Dargestellt ist eine Auswahl von Resistenzgen-spezifischen PCR-Produkten. Die entsprechenden Namen der Gene sind über den Spuren angegeben.

Zur Verifizierung der Echtheit der Amplikons wurden 48 ausgewählte PCR-Produkte sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken

verglichen. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass die Sequenzen der PCR-Produkte entweder 100 %ig mit denen der Zielgene übereinstimmten oder sehr hohe Ähnlichkeit mit einem sehr eng verwandten Resistenzgen zeigten.

## **9. Hybridisierung von Multiplex-Sonden gegen Resistenzgen-spezifische Amplikons**

Im Wesentlichen gibt es zwei Möglichkeiten, um unter Einsatz von Aminoallyl-dUTP eine Sonde für eine Hybridisierung herzustellen. Die Markierung der DNA kann mit der *Random Labeling* Methode oder mittels PCR durchgeführt werden. Bei der ersten Methode wird die zu markierende DNA durch oft schneidende Restriktionsenzyme verdaut, so dass kurze DNA Fragmente entstehen. Anschließend wird die DNA durch Hitzeeinwirkung denaturiert und unter Einsatz des Klenow-Enzyms, eines Hexanukleotid-Mixes und des dNTP-Mixes (Desoxynukleotide und das Aminoallyl-dUTP) wieder zum Doppelstrang ergänzt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass es zur Markierung der gesamten DNA und nicht zu einer spezifischen Markierung der Resistenzgene kommt. Es ist zu befürchten, dass unterrepräsentierte Sequenzen in der Hybridisierung nicht detektiert werden. Aufgrund dieses Nachteils wird die PCR als Methode der Sondenherstellung ausgewählt. Hierbei werden unter Einsatz von Resistenzgen-spezifischen Primern in mehreren Reaktionszyklen die Sondenmoleküle exponentiell vervielfältigt, wodurch auch Resistenzgene geringer Kopienzahl nachweisbar sein sollten. Mit dieser Methode ist es auch möglich, mehrere Resistenzgen-spezifische Amplikons in einem PCR-Ansatz (auch als Multiplex-PCR bezeichnet) zu erzeugen. Um festzustellen, ob bei dieser Variante auch alle möglichen Resistenzgene, die in der Probe vorhanden sind, als *Target* für eine Markierung dienen, werden in vier unabhängigen Multiplex PCR-Ansätzen jeweils 25, 50, 75 bzw. 100 Resistenzgen-spezifische Primerpaare vereinigt. Hierfür werden DIG-markierte Nukleotide zur Markierung der PCR-Amplikons verwendet. Das Ergebnis sind vier Sonden, die gegen die Resistenzgen-spezifische Amplikons (siehe Punkt 6.) hybridisiert werden. Bei dieser Methode der Hybridisierung, die als *Southern*-Hybridisierung bezeichnet wird, werden die PCR-Produkte elektrophoretisch in einem Agarosegel ihrer Größe nach getrennt, denaturiert und durch das Anlegen eines Vakuums auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert. Anschließend werden die zuvor hergestellten Sonden mit den immobilisierten PCR-Produkten auf der Nylonmembran hybridisiert. Gebildete Hybridmoleküle können in einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Durch die DIG-Markierung der DNA soll die maximale Zahl der Primerpaare ermittelt werden, die in einer Multiplex-PCR zwecks Sondenherstellung zum

Einsatz kommen können. Ein Beispiel einer solchen Hybridisierung ist in Abbildung 9 zu sehen.

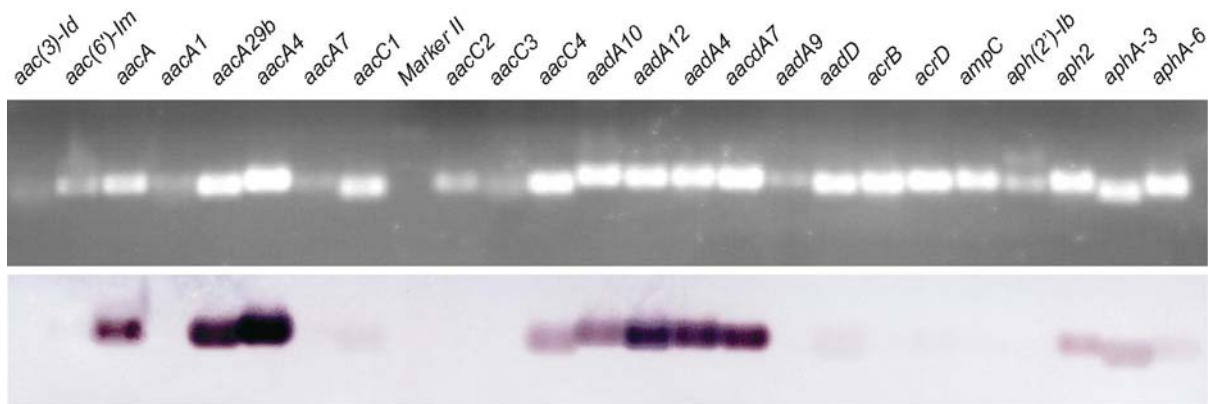


Abbildung 9: *Southern*-Hybridisierung zur Überprüfung der Effizienz der Markierung einer Sonde mittels Multiplex-PCR (exemplarische Darstellung).

Das obere Bild zeigt die PCR-Produkte (siehe Punkt 8), die, in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und gegen eine Multiplex-Sonde hybridisiert wurden. Das Ergebnis der Hybridisierung ist im unteren Bild zu sehen.

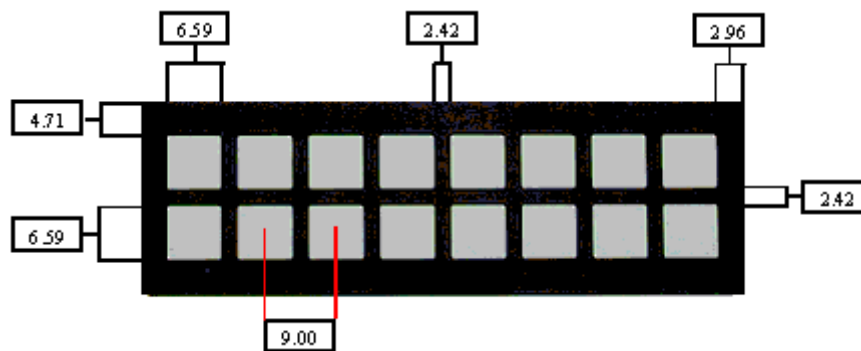
Die *Southern*-Hybridisierungen (mit Sonden, die in den Multiplex PCR-Ansätzen hergestellt wurden) konnten 72-84 % der angebotenen Resistenzgen-spezifischen Amplikons (siehe Punkt 8.) durch ein Hybridisierungssignal nachgewiesen werden. Das Fehlen der restlichen Signale könnte mit den unterschiedlichen Konzentrationen der PCR-Amplikons auf der Nylonmembran zusammenhängen. Diese Fehlerquelle würde aber bei einer Hybridisierung gegen das Resistenz-Microarray wegfallen, da immer die gleiche Menge an DNA in Form der Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotide gespottet und somit auch als *Template* angeboten wird. Aufgrund des hohen Anteils von nachgewiesenen Resistenzgen-spezifischen Sequenzen in einem DNA-Gemisch wird die hier beschriebene Methode auch zur Herstellung von Sonden für die Hybridisierung gegen das Microarray eingesetzt.

## 10. Layout und Fabrikation des Resistenz-Microarrays sowie Hybridisierung und Datenerfassung durch Fluoreszenzmessung

Zur Herstellung des Resistenz-Microarrays wurde der Nexterion Slide E MPX (Schott AG, Mainz, Deutschland) verwendet. Dieser Slide besteht aus 16 Grids (helle Kästchen in Abbildung 10A). Durch das Aufkleben einer *Superstructure* auf den Slide wird eine räumliche Trennung der einzelnen Grids voneinander erreicht. Dies ermöglicht theoretisch die gleichzeitige Verwendung von 16 unterschiedlichen Sonden, da jedes Grid für sich alleine behandelt werden kann. Aus technischen Gründen können jedoch nur 14 von den 16 Grids beladen werden. In jedem Grid wurden die Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotide in

zweifacher Kopie gespottet (siehe Abbildung 10B). Zum Spotten wird die Maschine Microgrid der Firma BioRobotics eingesetzt. Gespottet wird mit zwei Nadeln. Dabei wird eine Flüssigkeit mit einem darin gelösten Oligonukleotid in ein Reservoir aufgenommen und schrittweise an vorher festgelegten Positionen innerhalb eines Grids freigesetzt. Nach dem Aufbringen des Oligonukleotids auf das gesamte Array (alle 14 Grids), werden die Nadeln mit speziellen Puffern gewaschen und sind wieder zur Aufnahme einer Lösung, die das zweite Oligonukleotid enthält, bereit. Die Oligonukleotide binden dabei mit der angehängten Aminogruppe an die Epoxygruppen der aktivierten Glasoberfläche und eine stabile, kovalente Bindung entsteht.

A



B

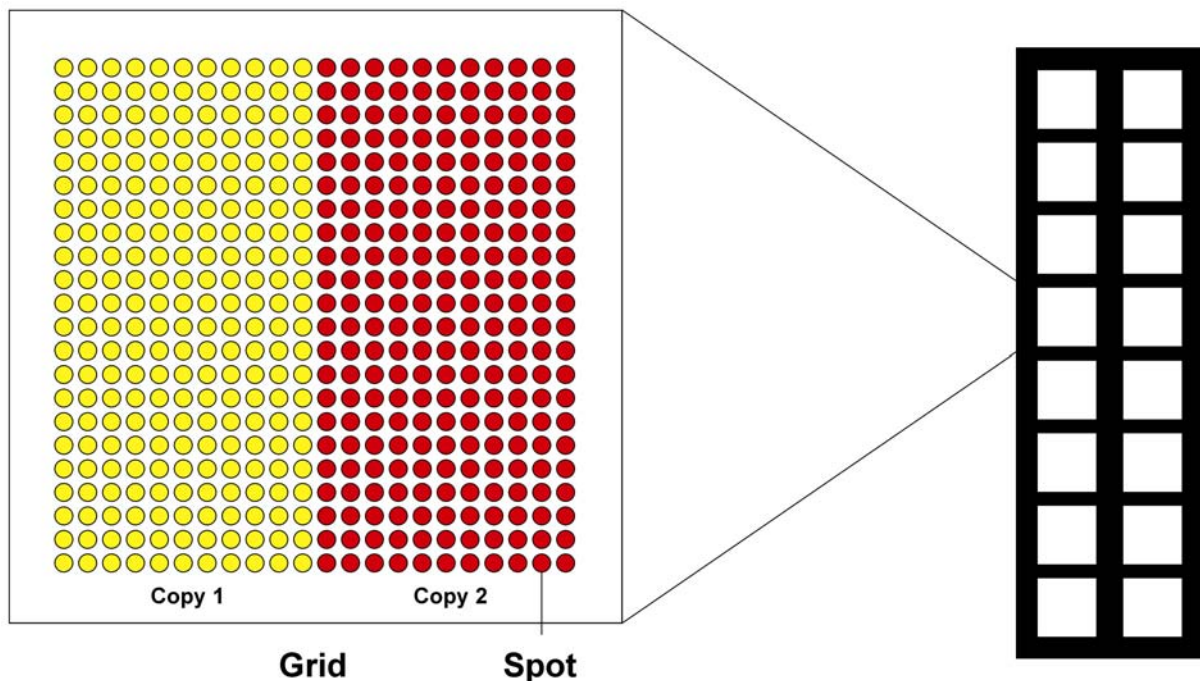


Abbildung 10: Der verwendete Glsträger (Nexterion Slide E MPX; Schott AG, Mainz, Deutschland) zur Immobilisierung der Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotide (A). Die Zahlen geben die jeweiligen Abstände in Millimeter an. Der Slide besteht aus 16 Grids. Das Layout des Resistenz-Microarrays (B). Jedes Oligonukleotid wurde zwei mal pro Grid gespottet (Copy 1 und Copy 2).

Die Sonde wird in einem 2-Stufen-Verfahren hergestellt. Im ersten Schritt erfolgt der Einbau von modifizierten Nukleotiden (aa-dUTP – Aminoallyl-dUTP) in das *Template* (z.B. mittels PCR). Im zweiten Schritt wird ein Farbstoff (z.B. Cy3) an die eingebauten modifizierten Nukleotide angehängt (siehe Abbildung 11).

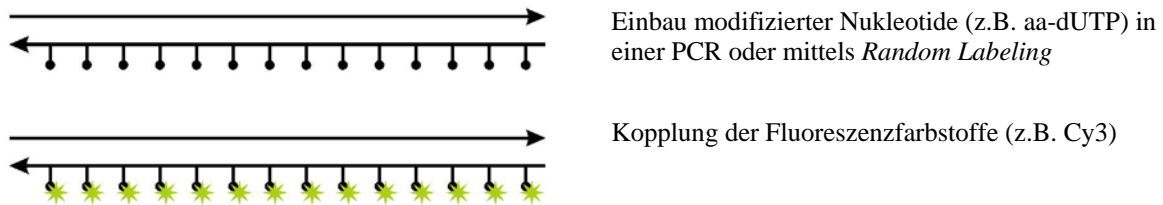


Abbildung 11: Sondenherstellung durch indirekte Markierung des DNA-Fragments.

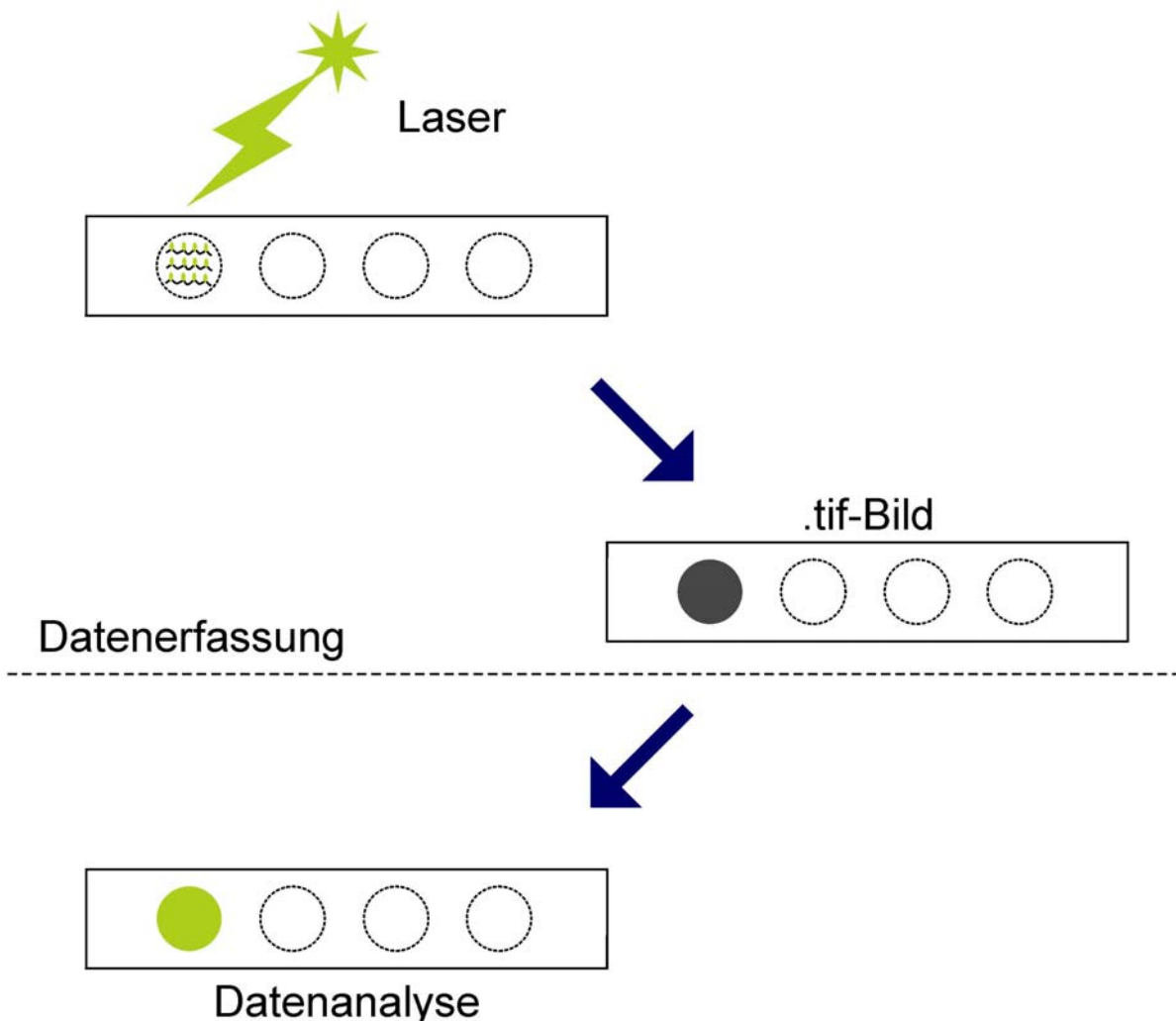


Abbildung 12: Datenerfassung durch Fluoreszenzmessung.

Nach erfolgter Hybridisierung werden die Signale im Tecan LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) ausgelesen. Dabei tastet ein Laser (Wellenlänge 532 nm) die Slide-Oberfläche ab. Trifft dieser nun auf einen Spot, an welchen

die markierte Sonde gebunden hat, dann wird ein Lichtsignal emittiert. Dieses Lichtsignal wird durch eine Kamera detektiert und dient der Datenanalyse (siehe Abbildung 12).

## 11. Effizienztest des Resistenz-Microarrays

Zur Überprüfung der Verlässlichkeit des Resistenzarrays wurden Sonden mit bekanntem Resistenzgen-Gehalt hergestellt. Als *Template* dienten die Plasmide pB3, pB4, pB8, pB10, pTB11, pRSB101, pRSB107 und pRSB111, die jeweils einzeln mittels *Random-Labeling* (Partieller Verdau der Plasmid-DNA, Denaturierung, Markierung der DNA durch Einbau von aa-dUTP durch das Klenow-Enzym während der Synthese des komplementären DNA-Stranges) markiert wurden. Zusätzlich wurden zwei weitere Sonden in Multiplex-PCRs hergestellt. Eine Sonde wurde mit einem Mix aus bereits sequenzierten Plasmiden (pB3, pB4, pB8, pB10, pTB11, pRSB101, pRSB105, pRSB107, pRSB111, pBGN2) als *Template* und Primern, die spezifisch für die auf den Plasmiden lokalisierten Resistenzgenen sind, synthetisiert (siehe Tabelle 7). Die nächste Sonde wurde mit der Master-Gesamt-Plasmid-DNA (siehe Kapitel 5.) als *Template* mit Fluoroquinolon-Resistenzgen-spezifischen Primern hergestellt. Für die Sonden 13 und 14, die mittels PCR hergestellt wurden, wurden die Plasmide pAG308 (*gfp*) und pB3 (*trfA*) als *Template* verwendet. Dabei wurden die Gene *gfp* und *trfA* (als negative und positive Kontrolle gedacht) markiert.

Zwei Beispiele der Hybridisierung sollen nun näher vorgestellt werden. Ein komplexes Hybridisierungsergebnis der Kontrollhybridisierung ist in Abbildung 13 dargestellt. Es handelt sich um die Hybridisierung des Microarrays mit einer Sonde, die in einer Multiplex-PCR hergestellt wurde. Dabei wurde ein Gemisch aus sequenzierten Plasmiden (pB3, pB4, pB8, pB10, pTB11, pRSB101, pRSB105, pRSB107, pRSB111, pBGN2) als *Template* verwendet und Primer, die spezifisch für die auf den Plasmiden lokalisierten Resistenzgenen sind. Die dabei markierten Resistenzgene sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Resistenzgene, für die spezifische Primer in einer Multiplex-PCR eingesetzt wurden, um eine Sonde für eine Kontrollhybridisierung herzustellen.

	Plasmidname									
	pB3	pB4	pB8	pB10	pTB11	pRSB101	pRSB105	pRSB107	pRSB111	pGNB2
<b>Resistenzgene *</b>	<i>bla<sub>NPS-2</sub>, cmlA1, sull, tetA</i>	<i>bla<sub>NPS-1</sub>, mexD</i>	<i>oxa2, qacF</i>	<i>strA, strB, tetA, trfA</i>	<i>aacA4, aadA1, aphA</i>	<i>aadA2, bla<sub>TLA-2</sub>, dhfrI, mph(A), orf11, qacEΔ1</i>	<i>dfrB2, mel, mph</i>	<i>aph, bla<sub>TEM1</sub>, catA, sullI, tetA</i>	<i>mph(B)</i>	<i>qnrS2</i>

\* Manche Resistenzgene kommen auf mehreren der angegebenen Plasmide vor und wurden in der Tabelle nicht mehrfach aufgeführt.

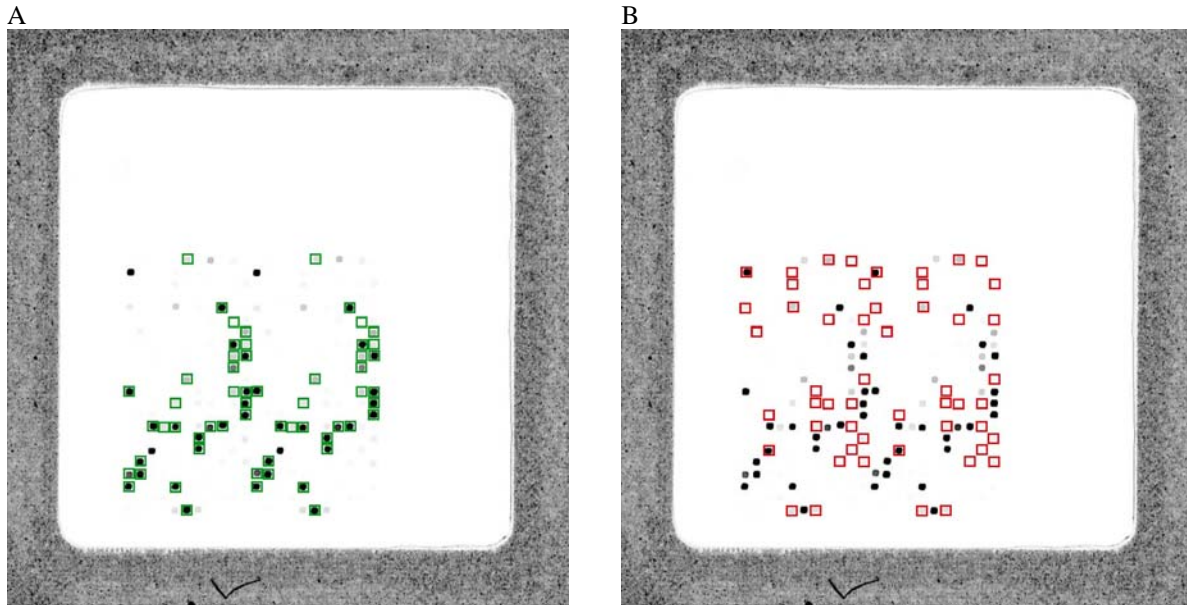


Abbildung 13: Nachweis von Resistenzgenen in einem Gemisch aus den bereits sequenzierten Plasmiden pB3, pB4, pB8, pB10, pTB11, pRSB101, pRSB105, pRSB107, pRSB111, pGNB2. Die Sonde wurde in einer Multiplex-PCR hergestellt mit einem Plasmid-Gemisch (siehe oben) als *Template*. A) Resistenzgene, die tatsächlich auf den sequenzierten Plasmiden vorkommen und detektiert werden konnten (grüne Kästchen). B) Resistenzgene, die nicht auf den sequenzierten Plasmiden vorkommen, aber in der Hybridisierung ein (wenn auch meistens ein sehr schwaches) Signal liefern (rote Kästchen).

Die Erfassung der Hybridisierungssignale erfolgt bei voller Laserstärke der Wellenlänge 532 nm und einer Photomultiplier Tube (Lichtverstärker)-Einstellung von 138 (ein Maß für die Verstärkung von Signalen des einfallenden Lichts) im Tecan LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) und liefert dimensionslose Werte für Signalintensität. Die visuelle Verarbeitung der Daten wurde mit dem Programm ImaGene (Version 6.0.1; BioDiscovery, Inc., El Segundo, CA, U.S.A.) durchgeführt.

Neben positiven Signalen (Abbildung 13A, Signale in grünen Kästchen) sind auch Signale zu detektieren, die nicht vorhanden sein sollten (Abbildung 13B, Signale in roten Kästchen). Obwohl alle in der Sonde vorhandenen Gene als Hybridisierungssignal auftauchen, so variiert die Intensität dieser Signale stark (zwischen 65535 und 2227). Dies ist wahrscheinlich auf die Methode der Sondenherstellung (Multiplex-PCR) zurückzuführen. So spielen z.B. die Kopienzahl des *Templates* und die Schmelztemperaturen der Primer eine entscheidende Rolle für die Bildung von Amplikons. Deswegen ist es nicht möglich, in einer Multiplex-PCR optimale Bedingungen für die Bildung aller möglichen PCR-Produkte einzustellen. Die zusätzlichen Signale, die nach der Hybridisierung der Sonde mit dem Microarray detektiert wurden, weisen fast ohne Ausnahme niedrige Intensitäten auf. Die Ausnahme stellt ein Signal dar, das für das Gen *cmlB* spezifisch ist. Die Signalstärke für das *cmlB*-Gen beträgt 48535 (Kopie 1) und 41806 (Kopie 2). Die starke Hybridisierung gegen dieses Oligonukleotid ist mit dem Vorkommen des sehr ähnlichen Gens *cmlA1* auf dem Plasmid pB3 zu erklären. Die



beiden Oligonukleotide, die *cmlA1* bzw. *cmlB* repräsentieren, unterscheiden sich nur in sechs Positionen. Die Hybridisierung gegen dieses Oligonukleotid könnte möglicherweise durch stringenter Hybridisierungsbedingungen geschwächt oder gar unterbunden werden.

Das zweite Beispiel zeigt die Hybridisierung des Microarrays gegen eine Sonde, die mit der Master-Gesamt-Plasmid-DNA als *Template* und mit Fluoroquinolon-Resistenzgen-spezifischen Primern in einer Multiplex-PCR hergestellt wurde (siehe Abbildung 14).

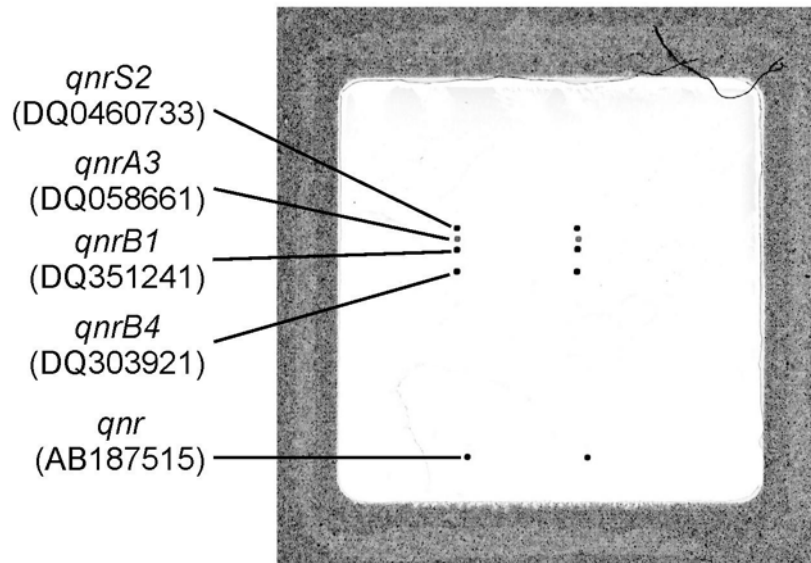


Abbildung 14: Nachweis von Fluoroquinolon-Resistenzgenen in der Master-Gesamt-Plasmid-DNA aus Belebtschlamm Bakterien. Die Nummern in Klammern geben die Accession No. für die Resistenzgene an, die für das Design von spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt wurden. Die Punkte in dem Grid stellen Hybridisierungssignale dar. Diese sind spezifisch für die Fluoroquinolon-Resistenzgene *qnr*, *qnrA3*, *qnrB1*, *qnrB4* und *qnrS2*.

Wie die Abbildung 14 zeigt, hybridisierte die Sonde ausschließlich gegen Oligonukleotide, die Fluoroquinolon-Resistenzgene repräsentieren. Die Punkte auf der rechten Seite des Grids repräsentieren jeweils die zweite Kopie der Oligonukleotide. Somit können Resistenzgene spezifisch in einem DNA-Gemisch nachgewiesen werden.

## 12. Ausblick

Erste Hybridisierungsversuche haben gezeigt, dass sich das Resistenz-Microarray zum Nachweis von Resistenzgenen in einem DNA-Gemisch eignet aber die Spezifität der Hybridisierung müsste verbessert werden. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des Microarrays sind:

- die Untersuchung weiterer Kompartimente der Kläranlage auf das Vorkommen von Resistenzgenen. Zu diesem Zweck liegen z.B. die Gesamt-Plasmid-DNAs aus Vorfluterbakterien bereits vor.

- die Untersuchung von Kläranlagen mit Zuläufen unterschiedlicher Herkunft. So könnten die Kläranlagen auf das Vorkommen von Resistenzgenen untersucht werden, i) die das Abwasser sowohl aus Krankenhäusern als auch aus privaten Haushalten und der Industrie erhalten und auch solche, ii) die das Abwasser nur aus einer oder iii) aus zwei der genannten Quellen beziehen.

### 13. Literatur

- Baquero, F. & Blázquez, J. (1997).** Evolution of antibiotic resistance. *Trends in Ecology & Evolution* **12**, 482-487.
- Bennett, P. M. (1999).** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 1-4.
- Bennett, P. M. (2004).** Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* **266**, 71-113.
- Blázquez, J., Navas, A., Gonzalo, P., Martínez, J. L. & Baquero, F. (1996).** Spread and evolution of natural plasmids harboring transposon Tn5. *Fems Microbiology Ecology* **19**, 63-71.
- Bönemann, G., Stiens, M., Pühler, A. & Schlüter, A. (2006).** Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3075-3080.
- Collis, C. M. & Hall, R. M. (1995).** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 155-162.
- Davies, J. (1994).** Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
- Davies, J. & Wright, G. D. (1997).** Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* **5**, 234-240.
- Davison, J. (1999).** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**, 73-91.
- Dröge, M., Pühler, A. & Selbitschka, W. (1998).** Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J Biotechnol* **64**, 75-90.
- Dröge, M., Pühler, A. & Selbitschka, W. (1999).** Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biology and Fertility of Soils* **29**, 221-245.
- Dröge, M., Pühler, A. & Selbitschka, W. (2000).** Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Mol Gen Genet* **263**, 471-482.
- Feuerpfeil, I., Lopez-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. & Szewzyk, R. (1999).** Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **42**, 37-50.
- Fontaine, T. D., 3rd & Hoadley, A. W. (1976).** Transferable drug resistance associated with coliforms isolated from hospital and domestic sewage. *Health Lab Sci* **13**, 238-245.
- Geisenberger, O., Ammendola, A., Christensen, B. B., Molin, S., Schleifer, K. H. & Eberl, L. (1999).** Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. *Fems Microbiology Letters* **174**, 9-17.

**Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M. & Angulo, F. J. (1998).** Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* **338**, 1333-1338.

**Gomez-Lus, R. (1998).** Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *Int Microbiol* **1**, 279-284.

**Guardabassi, L., Dalsgaard, A. & Olsen, J. E. (1999).** Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *J Appl Microbiol* **87**, 659-667.

**Hall, R. M. & Collis, C. M. (1995).** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **15**, 593-600.

**Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T. & Widmer, R. M. (1998).** Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 377-382.

**Hartmann, A., Golet, E. M., Gartiser, S., Alder, A. C., Koller, T. & Widmer, R. M. (1999).** Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol* **36**, 115-119.

**Heuer, H., Szczepanowski, R., Schneiker, S., Pühler, A., Top, E. M. & Schlüter, A. (2004).** The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1 $\beta$  group without any accessory genes. *Microbiology* **150**, 3591-3599.

**Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Wellington, E. M. H., Egan, S., van Elsas, J. D., van Overbeek, L., Collard, J. M., Guillaume, G., Karagouni, A. D., Nikolakopoulou, T. L. & Smalla, K. (2002).** Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *Fems Microbiology Ecology* **42**, 289-302.

**Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1998).** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**, 403-405.

**Kümmerer, K. (2001).** Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* **45**, 957-969.

**Kümmerer, K., Al-Ahmad, A. & Mersch-Sundermann, V. (2000).** Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* **40**, 701-710.

**Livermore, D. M. (2000).** Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med* **26 Suppl 1**, S14-21.

**Mach, P. A. & Grimes, D. J. (1982).** R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* **44**, 1395-1403.

**Marcinek, H., Wirth, R., Muscholl-Silberhorn, A. & Gauer, M. (1998).** *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* **64**, 626-632.

**Mazel, D. & Davies, J. (1999).** Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci* **56**, 742-754.

**Nüsslein, K., Maris, D., Timmis, K. & Dwyer, D. F. (1992).** Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3380-3386.

**Olsen, J. E. (1999).** Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. *Acta Vet Scand Suppl* **92**, 15-22.

**Osborn, A. M. & Boltner, D. (2002).** When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid* **48**, 202-212.

**Page, R. D. M. (1996).** TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.

**Rowe-Magnus, D. A. & Mazel, D. (1999).** Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol* **2**, 483-488.

**Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000).** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.

**Schlüter, A., Szczepanowski, R., Kurz, N., Schneiker, S., Krahn, I. & Pühler, A. (2007).** Erythromycin resistance plasmid pRSB105 isolated from a sewage treatment plant harbours a new macrolide resistance determinant, an integron-containing Tn402-like element and a large region of unknown function. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1952-1960.

**Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L. J., Thomas, C. M., Pühler, A. & Top, E. M. (2003).** The 64 508 bp IncP-1 $\beta$  antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 $\beta$  group. *Microbiology* **149**, 3139-3153.

**Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Poler, S. M., Schneiker, S., Pühler, A. & Top, E. M. (2005).** Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1 $\beta$  plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein. *Plasmid* **54**, 135-148.

**Seveno, N. A., Kallifidas, D., Smalla, K., van Elsas, J. D., Collard, J. M., Karagouni, A. D. & Wellington, E. M. H. (2002).** Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Reviews in Medical Microbiology* **13**, 15-27.

**Smalla, K. & Sobecky, P. A. (2002).** The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *Fems Microbiology Ecology* **42**, 165-175.

- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1997).** Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2884-2896.
- Sundström, L. (1998).** The potential of integrons and connected programmed rearrangements for mediating horizontal gene transfer. *APMIS Suppl* **84**, 37-42.
- Szczepanowski, R., Krahn, I., Bohn, N., Pühler, A. & Schlüter, A. (2007).** Novel macrolide resistance module carried by the IncP-1 $\beta$  resistance plasmid pRSB111, isolated from a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 673-678.
- Szczepanowski, R., Krahn, I., Linke, B., Goesmann, A., Pühler, A. & Schlüter, A. (2004).** Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology* **150**, 3613-3630.
- Szczepanowski, R., Braun, S., Riedel, V., Schneiker, S., Krahn, I., Pühler, A. & Schlüter, A. (2005).** The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology* **151**, 1095-1111.
- Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, N., Goesmann, A., Meyer, F. & Pühler, A. (2003).** The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 $\beta$  backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *bla*<sub>NPS-1</sub>, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol Genet Genomics* **268**, 570-584.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A. & Schlüter, A. (2003).** Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *Fems Microbiology Ecology* **45**, 239-252.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Krahn, I., Pühler, A. & Schlüter, A. (2005).** Sequence of the 68,869 bp IncP-1 $\alpha$  plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* **53**, 218-238.
- Top, E., Desmet, I., Verstraete, W., Dijkmans, R. & Mergeay, M. (1994).** Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 831-839.
- Tschäpe, H. (1994).** The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *Fems Microbiology Ecology* **15**, 23-31.
- van Overbeek, L. S., Wellington, E. M. H., Egan, S., Smalla, K., Heuer, H., Collard, J. M., Guillaume, G., Karagouni, A. D., Nikolakopoulou, T. L. & van Elsas, J. D. (2002).** Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *Fems Microbiology Ecology* **42**, 277-288.
- Witte, W. (1998).** Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997.

## 14. Anhang

### 14.1 Abbildungen

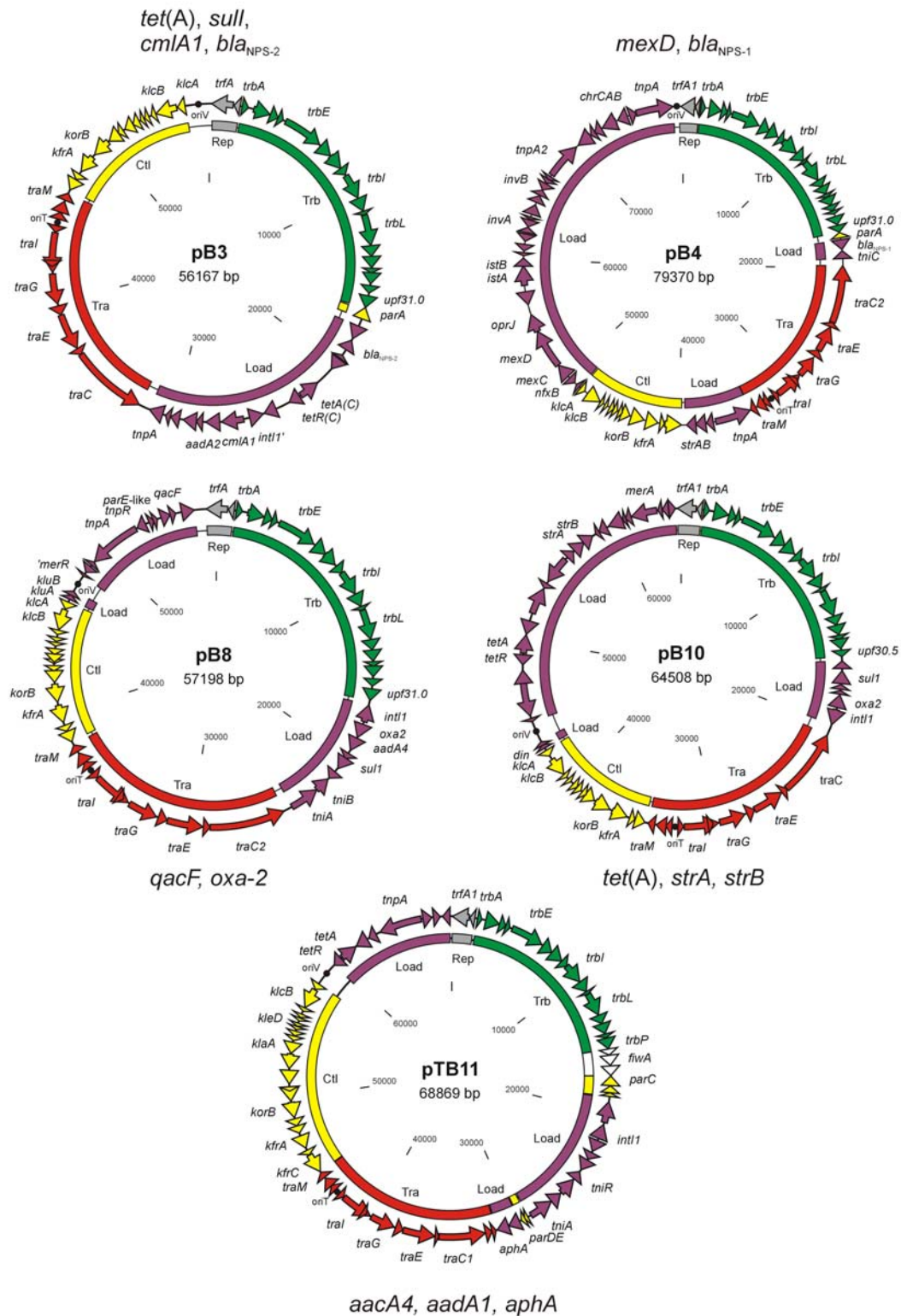


Abbildung A1: Ausgewählte Resistenzgene der IncP-1 Plasmide aus Bakterien kommunaler Abwasserkläranlagen. Die Resistenzgene, die für das Design von Oligos für das Resistenzarray ausgewählt wurden, sind über bzw. unter dem jeweiligen Plasmid, auf welchem sie sich befinden, angegeben.

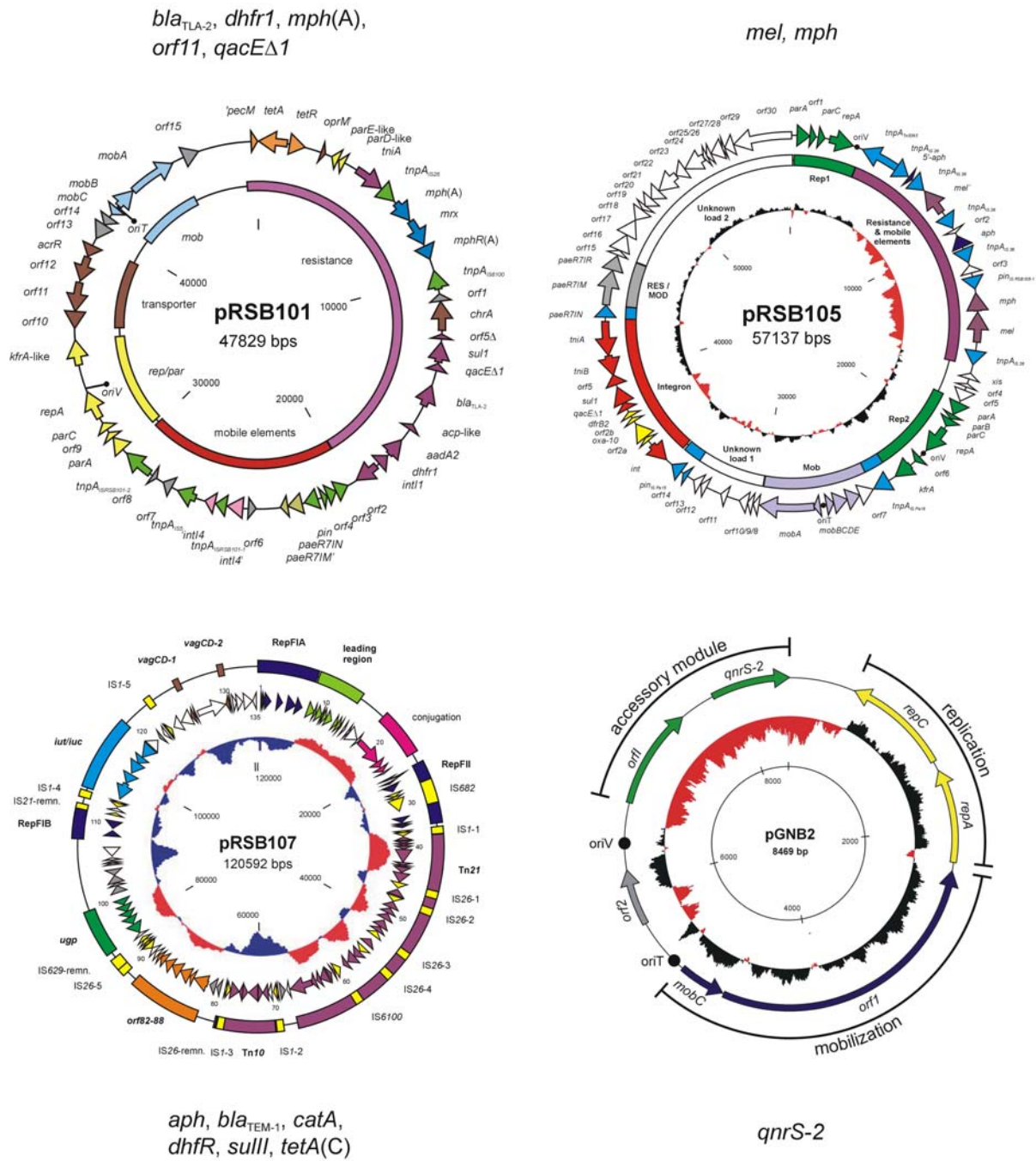
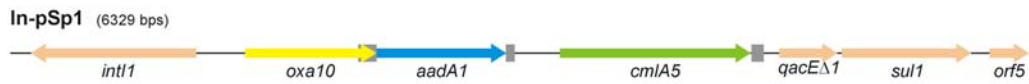


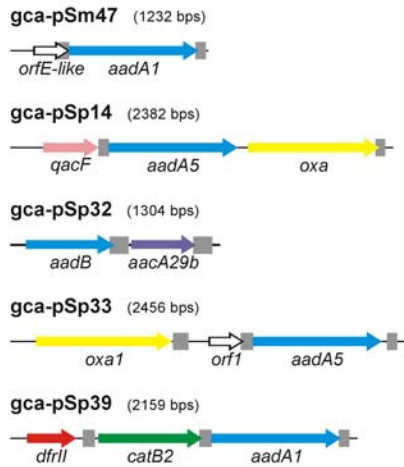
Abbildung A2: Die Erythromycin-Resistenzplasmide und das Quinolone-Resistenzplasmid pGNB-2 aus Bakterien einer kommunalen Abwasserkläranlage. Die Resistenzgene, die für das Design von Oligos für das Resistenzarray ausgewählt wurden, sind über bzw. unter dem jeweiligen Plasmid, auf welchem sie sich befinden, angegeben.



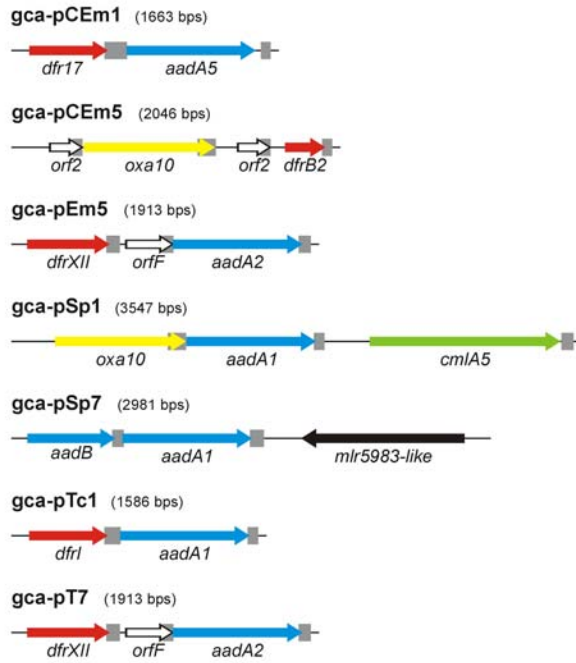
# A



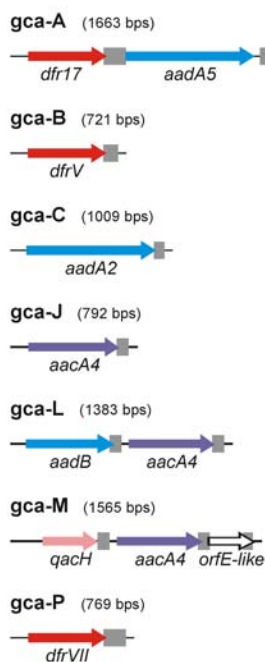
# B1



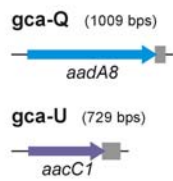
# B2



# C



# D



1 kb

Abbildung A3: Die Klasse 1 Integron-spezifischen Sequenzen aus Belebtschlamm- und Vorfluterbakterien einer kommunalen Abwasserkläranlage (Tennstedt *et al.*, 2003).

## 14.2 Tabellen

Tabelle A1: Die Resistenzgen-spezifischen Oligonukleotide (70 mere) und deren Charakteristika.

Genname*	Position im Gen		Schmelz- temperatur	Oligonukleotid-Sequenz
	Beginn	Ende		
aac3-Vb_M97172	721	790	80,6	tcggtcgcgaccctcctatctgtttgaagcgcaggatcgtctcgttcggcgtcacctatctcgaaca
aac(3)-Id_AY458224	57	126	78,3	aatgccatgttcggcgaggcattcaacgaccaagatagttatgcccgcaacaagccgtcatcaagctatc
aac(6')-Im_AF337947	326	395	77,7	gggaaatcgggtcagaatattgcagagtagtatccaatatctacgaacggaaatggatgccgatgcgggtg
aacA_M86913 (aacA_M86913, aadB_AY139594)	201	270	78,3	gtcatggaggagtggactatggattcttagcggagatcggggatgagttactgactgcgaacctgctt
aacA1_AB113580	189	258	77,7	gttgctggataggcttaagccaatgtacaaggaaacctgggaattgcatccattggtgtcagaccag
aacA4_NC_006352	85	154	78,3	cgacactgctgacgtacaggaacagtactgccaagcgttttagcgaagagtcctcactccatacat
aacA7_AF263520	55	124	78,8	taagcatgcgctgtgagctgtgccagatggcacatgcaagagcaccagtgcagagatcgcagaattct
aacA29b_AY139599	145	214	78,3	cggctgttggcatgtcgaactctcgataagacatgacttgaagaactccaaggaatcaagaccggcta
aacC1_AY139604	337	406	78,3	cgcttggctcttatgtgatctacgtgcaagcagattacgggtgacgatcccagtgctctctatacaaa
aacC2_S68058 (aacC2_S68058, aacC3_X13543)	529	598	78,3	atatcccaacaacgatgggtgacgtatgagatgccgatgcttggaaagaacctggaagtcgcctggaa
aacC3_X55652	600	669	78,3	cgcaaatgtgggtgaccgttgaggactatgacaccgggtgatccgcacgacgattatagttttgagcaaa
aacC4_X01385	500	569	78,3	gagacactgcaccattctcagatggcaagttggtacgcgtcgattatctcagaatgaccactgctgt
aadA4_AY138986 (aadA4_AY138986, aadA5_AY139588)	469	538	78,3	tgccgaacgagcattttccaaggccttttcgacacgattgccagtggaattcagagtcggattggaa
aadA7_AY463797	89	158	78,3	cgtgcattgtacggctccgactggatggcggattgaaccgtacagtgatattgattgctggtgact
aadA9_AJ420072	101	170	78,3	tggttctgcaattgatggtggcctcaaacatatagcgacattgatctgctggttaccgtggatgcacgc
aadA10_U37105 (aadA10_U37105, adA6/aadA10_AM087405)	217	286	78,3	tttcggtttccctggtcaaacgagagttctccgccttggaaagtaccattgctgtgcacagtgacat
aadA6/aadA10_AM087405	218	287	81,2	ttctgcctcccctggcacaagtgaggctctccgccttggaaagtaccatcgtcgtgcatggtgatgt
aadA12_AY665771 (aadA1_NC_006352, aadA23_AJ809407, aadA12_AY665771, aadA2_AY115474, aadA8_AY139603, aadA11_AJ567827, aadA13_AY940492)	110	179	78,3	agtggatggcggcctgaagccatacagcgaatgattgctggttacggtagaccgtaaggcttgatgaa
aadD_AB037420	111	180	78,3	ggctctctgtgctgcagactgatggcctattcggatattgagatgatgtgtgcatgcaacagagg
aph_AJ851089	71	140	78,3	tgggtataatgggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgcgacaatctatcattgatgggaagccc
aph2_U00004	547	616	78,8	atctcgtcgtgaccatggcgtgctcgttggcgaatcatggtggaaaatggccgtttctggatt
aph(2')-Ib_AF337947	691	760	75,3	cagatgattcgggaaagaattggcagggaaggtattaaaatactatcagcataaagccggcggagtagc
aphA_NC_006352	144	213	78,3	ggctccgactgtttctgaagcacggcaagatgcttttccgacgacgtgactgataaatggtgagat
aphA-3_V01547	131	200	78,3	aatgacggacagccggatataaaggaccacctatgatgtggaacgggaaaaggacatgatgctatggctg

aphA-6_X07753	142	211	76,5	cagagaccacatacagtgtctctcgtgaagcgaaaatgftgagttggctctctgagaaattaaagtgcc
aphA-7_M29953	472	541	75,9	cgttatcatcagtggttgcgaaaatcaacctcaagaagaactgtgtctctcatggagatagagcgc
strA_NC_004840	523	592	78,3	gcaccgatatggttggccatggtgatccctgatgccgaactcatggtggacctaaactctca
strB_NC_004840	52	121	78,3	tcattgaggacacctttccagcctcgttggaaaagttcattgccagacgggactcctgcaatcgtcaa
ampC_J01611	70	139	78,3	tcaacgatattgtcatcgcacaattaccocgcttatagagcaaaaaagatccccgggtatggcggtggc
blaCMY-9_AB061794 (blaCMY-9_AB061794, cmy-10_AF357597)	625	694	78,3	accacacctatgcaatgtgccgaagcaggccatggcgagttatgctatgctattcgaagaggacaa
cmy-13_AY339625 (cmy-13_AY339625, cmy-5_Y17716)	50	119	78,3	cacgttgcctccgcaaaaacagaacaacagattgccgatatcgtaatcgcacatcaccccggtgatg
ctx-m26_AY157676 (ctx-m26_AY157676, ctx-m8_AF189721)	239	308	78,3	agcggcggtgcttaagcaaaagtgaacgcaaaagggttggagtcagcgggttgaattaagccctca
ctx-m8_AF189721	240	309	75,3	agcggctgtgctcaagcaaaagtgaacgcaaaagaaggttggagtcagaaggttggagtaaatctca
ctx-m27_AY156923	150	219	78,3	gcgctcatcgataaccgagataatcagcaggtgctttatcgcggtgatgaacgcttccaatgfcagta
ctx-m32_AJ557142	93	162	78,3	gacgtacagcaaaaactgcccgaattagagcggcagtcgggagggaagactgggtggtgattgaaaca
ctx-m4_Y14156	153	222	78,3	cagattaacaccgccgataattcgcagattctctacgtggccgatgagcgtttgcatgctgacgtacca
ges-3_AY494717	63	132	78,3	ttaacctcaagaccgatcttgaagaagctagagcgcgaaaagcagctcagatcgggttgcgctcgcg
imp-2_AJ243491 (imp-2_AJ243491, imp-5_AF290912)	238	307	78,3	ggtttggagcgcggctataaaatcaaggcactatttctcacattccatagcgacagcacaggggg
imp-2_AJ243491	616	685	74,7	gttaaagcaaaactggttgttcaagtcagtagtgaattggggacgcatcactctgaaacgtacatggg
imp-5_AF290912 (imp-10_AB074433, imp-4_AF244145, imp-5_AF290912, bla-IMP-7_AF318077, blaIMP-9_AY033653)	277	346	77,7	cctctcatttcatagcgacagcacggcggaatagagtgcttaattcctcaatctatccccacgtatgc
imp-5_AF290912 (imp-5_AF290912, imp-11_AB074437)	277	346	77,7	cctctcatttcatagcgacagcacggcggaatagagtgcttaattcctcaatctatccccacgtatgc
imp-5_AF290912	616	685	76,5	ggtaaggcaaaactggtagtccaagtcacagtggaattggagacgcatcactctgaaacgtacgttag
blaIMP-9_AY033653 (blaIMP-9_AY033653, imp-11_AB074437)	453	522	78,3	tatcctggtccagggcacgctccagataacgtagtggttggctgcctgaaaatagagttttgctggtg
imp-11_AB074437	454	523	74,7	taccaggcccagggcacactcaagataacgtagtggttggctacctaaaataaaacttatttgggtg
imp-13_AJ550807 (imp-13_AJ550807, imp-2_AJ243491)	115	184	77,7	cgttcgaagaggttaacggttggggggttactactaaacaggttagtggtgctgtaaacacagacgc
imp-16_AJ584652 (imp-16_AJ584652, imp-2_AJ243491, imp-11_AB074437)	615	684	78,3	ggtaatgcaaaactggttgtccaagccatagtgacgtcggagatcgtcgtcttgaagcttacatggg
imp-16_AJ584652 (imp-16_AJ584652, imp-5_AF290912, imp-12_AJ420864, imp-13_AJ550807)	615	684	78,3	ggtaatgcaaaactggttgtccaagccatagtgacgtcggagatcgtcgtcttgaagcttacatggg
kpc-3_AF395881	270	339	78,3	gacacaccatccgttacggcaaaaatcgctggttcggtgaccatctcgaaaaatatctgacaa
nps-1_NC_006388	53	122	78,3	tgccgaagattcggcagtcgaaactgtttcgcagtgcatatcgacggaaccatcgtgatcgaatct
nps-2_NC_003430	145	214	78,3	ttcaaacgatcctcgtgcgcaacaacgataaccggcagcttccagctcaaggtactcaatccttgat
oxa-1_AY139600	138	207	76,5	tacgatgatccacaacgctgaattgctcaattcaataaagcaagtgccgagcgcgaatggcaccag
oxa-2_NC_007502 (oxa-2_NC_007502, oxa-21_Y10693, oxa-53_AY289608)	50	119	78,3	tttcgcatcgcgaagaaggcacgctagaacttctgactggaggaagttttcagcgaattcaagcc
oxa-5_X58272	218	287	78,3	tgctctaataaggtcttgaaccggcgccataaagatgaacggcaggtttcaaatgggacggcaagccc

oxa-9_M55547	50	119	78,3	cccaatcagttccgtggcttctgatgaggttgaacgcttaaatgcaccatcatcgcagacgccattacc
oxa-10_AY115475 (oxa_AY115475, oxa-56_AY445080)	605	674	78,3	gcattcaaaaaactggttttctggtgtgggaactgagtcacatcctggtgctgcatggtgggtgggtgg
oxa-12_U10251	672	741	78,8	aaaccgggcaagcagctcattttcgttcataccgtggtgcagaaccgggcaagcaattcgcctcatca
oxa-18_U85514	60	129	78,3	atttcaacggtttgccttacgttctccccggcaaatgccgcacaaaaactgtcctgcacgctgttatcg
oxa-20_AF024602	141	210	78,3	gatgaacgcacaaaaggtaattccacatcggtttataatgaatccccgggctcagcagcgctattcgcctg
oxa-22_AF064820	292	361	81,2	tgtggctcaagtattcgggtgctgtattcgcagcgcattacgcatgcatggggcgcgacacctcca
oxa-27_AF201828	337	406	78,3	gggaaaaagacatgacactaggagaagccatgaagctttctgcagtcaccagtctatcaggaacttgcgcg
oxa-29_AJ400619	391	460	78,3	ccggcgacaaaggtcagaataatggattaaccattcctggctatcaagctcgttgcctatcaccaag
oxa-40_AF509241	360	429	78,3	ttaggtgagcaatggcattgtcagcagttccagtatacaagagcttgaagacggactggcctagagc
oxa-45_AJ519683	196	265	78,3	atgctggcattctgtggacgcgataatccgcgctgggactacaagccggaattcaatggctacaatt
oxa-46_AF317511 (oxa-46_AF317511, oxa_AY139598)	50	119	78,3	attcgtgtatgcgcaagaacatgtggtaatccgttcggactgaaaaagtcttcagcgcactccaggcc
oxa-48_AY236073	222	291	78,3	cccaatagcttgcacccctcgaattggcgctggttaaggatgaacaccaagctttaaagtgggatggac
oxa-50_AY306130	439	508	80,0	agggttgggataacttctggttggggaccgctgaagatcagcgcgatggaacagaccgcttctgct
oxa-54_AY500137	242	311	78,3	ggatttaggtgctggaaggatgagcatcaagctttaaattgggatggacagactcgggatatcggcg
oxa-55_AY343493	159	228	78,3	cgctgggacaagctgttcgaatccgcagggagtaaggcagtttctgcttgggatcaaaagcgttctt
oxa-58_AY665723	616	685	78,3	tgtgtatgtagagcgcagaggggagaatcgtctatatgctaaaagtggctggggaatggctgtagacc
oxa-60_AF525303	373	442	81,8	cgatctatcaggaaagtcgcgcgccgttggctcgcagcgcagcgttatgctgatgcttcgacta
oxa-61_AY587956	106	175	76,5	ttatgatgaaaaacttggcgagtaacgactttcaaggctatggagactttctcccgttccac
oxa-75_AY859529	643	712	78,3	acgcaaaaagtgttggggatgggatgtaaacccacaagtaggctggttaactggatgggttgcagcc
per-1_Z21957	103	172	78,3	ttgaatccatagtcattggaaaaaagccactgtagcgttgagtggtgggctgacgatcggaaacc
per-2_X93314	92	161	78,3	aaaagagcagattgaaaccatagtgacgggtaaaaaggccactgtagggtgtagcagtggtggggcctgac
shv-34_AY036620	68	137	78,3	gcagccgcttgagcaaaataaactaaagcgaagccagctgtcgggcagcgttaggcatgatagaaatggat
TEM-1_AJ851089	66	135	78,3	gctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttcatcag
tla-1_AF148067	688	757	78,3	ctaccggaccgaaacgactcaaaaggacttttgcccgatggaactgttggctcataaaaccggaagctc
tla-2_NC_006385	304	373	78,3	aaaagatcttcatcccgaacttggagtcctctgcgcgacaaatccgaatggcggagtgagcattcc
vcb-1_AF010416	286	355	75,9	cccctcaagacttttgcttaaacctggagtcgattaaagaggaattccctaatggaacaactttgac
vim-4_AY509609 (vim-4_AY509609, vim-5_AY144612, vim-12_DQ143913, vim-2_AF263520)	178	247	78,3	agtcgttggatggcgcggtctaccgtccaatggtctcattgtccgtgatggtgatgagttgctttgat
vim-7_AJ536835	87	156	78,3	ggtgaatatccgacagtagatgacataccggtaggggaagttcggctgtacaagattggcagtgccgtt
cat_M11587	206	275	77,1	acatgcagaattccgcatggcaatgaaagacggggaattggtgatatgggatagtttaaccctgggtac
cat_M35190	374	443	77,7	gtccgcaaaagcctaatcctccgaaaacactttccctgttctatgataccgtggacaagcttgaagcc
cat_M58515 (cat_M58515, cat_X68412, cat_NC_005243)	520	589	72,4	agtaagaataataagatctatttaccagtctcattgcaagttcatcatgcggtatggtatggttaccatg
cat_S48276	141	210	77,7	cccgccctttgatccgtttcaacagtagttaaccggcatgaaagattccgatgactgtggacgatg
cat_U38429	520	589	72,4	gtgagaataataaaattatataaccagttgccttacagcttcatcagctgatggtatggttaccatgc

cat2_AY509004 (cat2_AY509004, cmlA_X53796, catII_X53797)	60	129	78,3	cgctcagcagattaaatgctgattcagcctgaccaccaactcgatattaccgcttgcgtactgcactgg
catIII_X07848	516	585	77,7	cagcaagaaggggatagactgtattgccgtctcagtacaggtcatcatgcagttgtgatgcttcc
catA_AJ851089	168	237	78,3	ccggcctttatcattcttccccctgatgaatgctcatccggaattccgatgccaatgaagacg
catB2_AY139601	65	134	78,3	catcaaggtagggcggatagctactattccggctattaccatgggcactcgtttgatgattgtgctcgc
catB4_AF322577	65	134	78,3	tatcaaagttggcggtacagctattactctggctactatcatgggcactcattcgcactgcgcacgg
catB6_AJ223604	75	144	78,3	ggcggtagcactactctggtactatcacggcattcattgatgactgcgcacgatactgtctcc
catB7_AF036933	476	545	80,6	gaccattcgtaaagcgtttccgatggcgatattccagaacctgctggaaatggcctggggactggcca
catB8_AF227506	68	137	78,3	cagagtaggccggtatagctattactctggctactatcacggcactcattgatgaatgcgcgatac
catB9_AF462019	288	357	77,7	gcagatgcacgcgatggtttacgcgttcaggagacacaattattggtcatgatgtgtggattggcactg
catP_U15027	175	244	75,3	accgccattcagagtttagcagccaatcaatcaagatggtgaattgggatatgatgatgatgatacc
cat-TC_U75299 (cat-TC_U75299, cat_AJ312056)	163	232	74,2	tcttagtgacaaggggtataaactcaatacagctttagaactggtfacaatagccagcggagagttagg
cmlA_CT025832	477	546	82,4	tgcgctgatcggcgagtttggggatggcagcgcgatctcatcacactggctgcactggcttcgctcgca
cmlA1_NC_006388 (cmlA1_NC_006388, cmlA5_AY115475)	52	121	78,3	tgtatcaccgctcatttattggcactcctggcatggacatgacttcccggcagtgccgtttatgcc
cmlB_AF034958	52	121	78,3	tgtatcaccttccgatttactggcactcctggcatggacatgacttcccagcggcttccatgcc
cmxA_AF024666	204	273	80,0	ctcacattgatcgtttgcctctcgtgtcggggaagccacgtcatcggagcgcgatgacaccaggttct
fexA_AJ549214	302	371	78,3	tttagtgcaattgccccgaacctccattgtgtttgggaagaatggttcagggtgctgggatgccc
floR_AF118107 (floR_AF332662, floR_AJ518835, floR_AF118107, cmlA_CT025832)	476	545	78,3	agcattgatcggcgagttcttgggatggcagcgcgatattcattcttggctactggcgatgctcgca
qnr_AB187515 (qnr_AB187515, qnrS2_DQ460733)	53	122	78,3	aagtgatctcacctcaccgcttgcacattcctcgcagcacttccagctgtaactgcgtgatacgc
qnrS2_DQ460733	54	123	75,9	aagtgatattacttccactgcttgcaccttatccgatcggatttccagctgtaactgcgtgatacgc
qnrA3_DQ058661 (qnrA3_DQ058661, qnr_AY070235)	50	119	78,3	ttgagtgacagtcgtttccgctgccctttatcagtgctgactcagcattgccagtaaggat
qnrB1_DQ351241 (qnrB1_DQ351241, qnrB2_AM234698, qnrB5_DQ303919)	124	193	78,3	ttcaggtgccacctgagcggcactgaattatcggctgtcagttctatgatcgtgaaagccagaaagg
qnrB4_DQ303921	204	273	78,3	agttgtgatctcctcagctgattcaggaataatgcgctgggaatcgaattcgcactgccggg
ereA2_AF512546 (ereA2_AF512546, ereA_AY183453)	100	169	78,3	gcattggcgaggggtcactttgtcgggagttctcactggctagagctagtcttattcgtattttgt
ereB_X03988	723	792	78,3	gctatgtcggcctttattcagggagcgggaatgcagggcgatattgggtgcaaaaagacaatacatggcag
erm(A)_X03216	152	221	75,3	gagtcgatcagttactgctatagaattgatggagccttatgtaagtgactaaaagcggtaaacccc
erm(GT)_M64090	105	174	73,6	gagattggtcagggaaaggtcatttctcgtttgaattagctaaaaggtgtaattatgtaaccgcttg
erm(TR)_AF002716	111	180	75,3	gggtcaggaagacattttccaaggaactgtggaaatgagtcacagggtgaaatgctatagagattg
erm(Y)-erm(GM)_AB014481	111	180	72,4	gggtcaggaagggcatttccactagaactgttcaaaaatgtaattatgtaaacgattatcagagatag
ermA_X51472	52	121	78,3	accacaagatcatcaactccatcatcgacttgtgaacaaacctccggccccatattgagatcggacc
ermB_M11180	408	477	78,3	attcaccgaactaggggtgcttctgacactcaagctcgttgcactcagcaattgcttaagctgccagcgg
ermC_M17990	101	170	74,7	ctttgaaatcggctcaggaagggcattttaccctgaaatgtagcagaggtgtaattcgaactgcc

ermD_M29832	147	216	78,3	gagtagtagagcgggaaaaggggctttgacaactgtgctaagtcaaaaagccggaaggtattggcagtg
ermF_M14730	467	536	76,5	tgatttgaactgtctatgaggtaggtctgaaagtttctgccaccgcaactgtcaaatcagccctg
ermG_M15332	101	170	73,6	ctttgaaataggtgcagggaaagggtcatttactgctgaattggtaaagagatgaattttgttacggcg
lnu(A)_J03947	62	131	75,3	ggaagtaactcattggtagatggaggctggggcgtagatgtattaactgaaaacaacaagagaacac
mefA_AJ715499	330	399	78,3	atccgtagcattggaacagctttcacacccggctctcaatgcggttacgccacttttagtaccagaag
mefE_AE008470	1021	1090	75,3	ctgagtttctcggtagagtctttggaatcatctttacggtagctattcttttatgccagttgggctg
mefE_AF274302 (mefE_AF274302, mefI_AJ971089)	171	240	77,7	gcgattttgggacctgccattggtgtgctagtgatcgtcatgataggaaagaagataatgattggtgccg
mph(A)_NC_006385	559	628	80,6	attcgtcgtggccagatttctccgtgggtgcatggcgatctctacgtggccatgctcatcgacaa
mph(B)_AM260957	296	365	78,3	gctgacattgacgctcgcacatgatgacgacgtggcactttgaccagaattctccggtctatgtttaa
mph(BM)_AF167161	614	683	78,3	ggtagataaccaagcaaacgtcacaggtctcatagactggactgaagcaaccactccgacctcaatg
mph_DQ839391	92	161	78,3	ggctgttttctctgatacaaaagggaacaatggtgctgctgctgctgctgattcctcctgctgtaggcatgagg
mphB_D85892	369	438	78,3	cacaagtcgctagggcgggtgttagcagagcttcatagcatacctagtaataaagccgacgctttagtc
mel_DQ839391	183	252	78,3	cagcgttttgggtattttgcacatatcagccaactggcggaatcgaatagaacggctcgaagaccggg
vgb(B)_AF015628	521	590	78,3	agaatactctaccaacaaatgcagcggctccagtgggtatcactagtggtaacgatgctgactctgg
vgh(A)_M20129	664	733	78,3	cgccaaacgctcgacctcatgcaattactgctggagcagggaattgatttatggttactgaatggggggc
mecA_AB037671	1032	1101	76,5	ggctcagtgactgctatccacctcaaacaggtgaattattagcacttgaagcacaccttcatatgacg
qacB_AF053771	936	1005	78,3	ggcttatacttacctatggcaataggagctatgggtttgcaccaattgcaccggattagcggcgc
qacD_M37888	149	218	75,3	gcaacacctaccactaaataacttatgcaactggggggactaggttagtcttaacaaccgtagtc
qacEDelta1_NC_006385	132	201	78,3	tatttttctctggttctgaaatccatccctgctggtgttcttatgcagctgctgctgggactcggcg
qacF_NC_007502	87	156	78,3	ctgggtccaagcgtatcgtggtggctgctgctgctgctgcttctatttctgctgattacctcaagt
qacF_AY139598 (_AY139598, qacH_AY139595)	51	120	78,3	actccgcactgaagtctagccatggattcactaggttagtcttccgtttagttagtggctggctacg
qacG_Y16944	158	227	72,4	gccctaaatataacttacgcaacatggcaggtctagatttagtattaacaacaataatctcagttatc
qacG2_AJ609296	51	120	78,3	acctctgcgctcaagctagtggggcttactaggttagtaccgcttttatcgtcgtagcgggatac
qacH_Y16945	132	201	71,8	ttctgagtaaaactatgcaacatttaccacttaataattacttacgcaagttggcgaggttaggattag
arr2_AF205943	66	135	78,3	ggaaccaaaagccaatttggcattggtgactgtaaccacagggttcatctctatttcgaggacggctc
acrB_M94248	149	218	78,3	cggcgtgatcgaaaacagtcaggacacggtgacacaggtatcgaacagaatatgaacggatcgtgat
acrD_U12598	77	146	78,3	gatttttctcattgcccgttgaacaataccccgatctcgcgccaccgaatgctgagtgaccgctaactat
mexB_L11616	415	484	79,4	tggtcgggtgtggttccaccgacggcagcatgaccaaggaagacctgtcgaactacatcgtttcaacat
mexD_NC_003430	390	459	78,3	caggctccgccggttctgctgatctatgccctgcgctacaagatggcgttaatcacgaaaacta
mexD_U57969	2080	2149	78,8	aggctcgcgatacttcttggcgagatccagcaaccgaaattctttacgcatgatggaaggact
mexF_X99514	688	757	78,3	ataccatcttcagttgctgatcaacaccagggctgctgctaccgaaagaaggttcgagaacatcat
mexI_AE004837	2685	2754	80,6	acgatgaacatctatcagcatcggcctggtcaccctgatcggcctgatcagcaagcacggcatcctca
mexY_AB015853	2751	2820	80,0	aacgacatctactcaaggtcggcctgatccatcatcggcctctcggcaagaagccatcctcatca
orf11_NC_006385	533	602	78,3	gatggtattcctccgctcaaggtgccaagaggctcagttcctcaagataacgacgccatttggcaa

msr(A)_X52085	717	786	75,9	gcaccagatcgtttaagtcatcaaaagaaaaaggcacggttgagaaggctgctcaaaaacaagctaagc
sulI_NC_006388	525	594	78,8	atgggattttcttgagccccgcaccggaacatcgctgcacgtgctgcaacctcaaaagctgaagt
sulII_AJ851089	291	360	78,3	cgtggtgtggcctatctcaatgatattcgcggtttccagacgctgcttctatccgcaattggcgaat
sul3_AY316203	108	177	78,3	gatggagcagatgtgattgattgggagccgctccagtaacctgatacaactgaagtggcgctgtgg
dfr13-dfrXIII_Z50802	55	124	78,3	ttattggcaatgtcccgatcccctggaaaatcccaggtgagcagaagattttcgcaggctcaccga
dfr16_AY259085	124	193	76,5	tagttggacgcaaaacttttgagtcaatggcgctctcccaaatcgaagatgacagttgtaactcgtc
dfr17_AY139588 (dfr17_AY139588, dfrVII_AY139596)	61	130	76,5	tcccggtgctcagtaaagggtgagcaactactctttaaagcgctcacatataatcaatggctccttgcgg
dfrA10-dhfrX_L06418	471	540	75,3	ggtgatccaatagattctgtgatagcttctctattgataagttgtagaccagcttcgctggtgggg
dfrA19_AM234698	60	129	78,3	ggcggcaagattccatgaaatgcaagaagacatggcgcgatttacgcggatttcaagagatccgcg
dfrB2_DQ839391	88	157	78,8	tacgcaagaaatctggtgccgcttggcagggtaagtcgctggtgattgcacaaaactactcctga
dfrD_Z50141	113	182	74,2	cactacaaaaggacatgcaatcatataggtagaagaacctcaatcaatcggaagggcttactctgac
dfrII_AY139601	78	147	78,3	gtcagtaatccagttgctggcaatttctattccatcgaacgccacgttggtagggagatcgcgtgc
dfrV_AY139589	55	124	78,3	cacacatacctggctccgcaagagagcagctactctttaaagccttgacgtacaaccagtgctttt
dfrVI_Z86002	63	132	77,1	ccttggcatgtacaaggcagcagctcctattcaagccatgacttacaatcaatggctctagttgctc
dfrXII_AY139605	76	145	78,3	tcccctggaaaattccgggtgagcagaagattttcgcagactactgagggaaaagtcgttgcattggg
dhfr_J03306	54	123	78,3	aatcttattccatggcatctactcgcgatctgcgtcatttcaaagctgtcacctggggaaacctgtgg
dhfr_Z74777	105	174	78,3	gaaacaactctgaatcatgctatcttgatggggcgggtaaccttggatggaatggggcgtcgttgcctc
dhfr1_NC_006385	98	167	77,7	ccaatggctgtggtggacgcaagactttgaaatcaatgggagcattaccaaccgaaagatgcggtc
dhfrIX_X57730	140	209	78,3	aactttgcctactgcctaaagtgcctgccggacgactcatgtgtagtcaagtaaacagtagaccacc
dhfrVIII_U10186	51	120	78,3	aaggacaacgcactccctgccaccactaaaaggcgatctgccagattcaaaaaattgaccatgggga
dhfrXV_Z83311	114	183	78,3	cagtggtctttgtaggccgaaagacttgcagtcagtcaatggggccttaccacaaccgaaatagccgttg
effJ-tet(35)_AF353562	50	119	78,3	catcggtggtatcttgggtgcacacggcatcactgaatactggcgcttgggtgcttacgttcttatt
tet(30)_AF090987	573	642	78,3	ttcaaggaacttaaccggtggccattggtgtgcttggaaattcaagcgcctcctgccacttghaa
tet(31)_AJ250203	200	269	78,3	ctttcaacctcaaaaggcagtagtactggcggttttctgcgagaaaatgcgaaaagcttcttagggcg
tet(32)_AJ295238	252	321	78,3	gcataccgctcttctatctgcttgcacggagctgttttagtcatcttgcgaaaagacggcgtacagccac
tet(34)_AB061440	108	177	78,3	cgtggcggtctagtagccgggtgctattcttgcgctggaacttgattcgtcaggtgataccatttga
tet(36)_AJ514254	214	283	78,3	tcatcgacactcctggacacatggacttctggcagaggtagaacgcacttttaggatgctagatggctc
tet(37)_AF540889	164	233	78,3	atatgagactgattccaggttggattctgctacggaacgatgatgggaacacagaggatcgacaccg
tet(38)_AY825285	127	196	76,5	ctgtaacgacagtaagttggcaagcgacattagccggttagtaattggtattggcctgtagtatacgc
tet(M)_M21136	1294	1363	78,3	ttcacatgaaagtggcccaaatccttctggccttccattggttattctgtatcaccgcttccgttggg
tet(M)_M85225	1294	1363	78,3	ttcacatgaaagtggcccaaatccttctggccttccattggttattctgtatcaccgcttccgttggg
tet(M)_X04388	996	1065	78,3	ttgccacagagagagaaattgaaaatcccctcctctgctgcaaacgactgttgaaccgagcaaacctc
tet(M)_X90939	996	1065	78,3	ttgccacagagagagaaattgaaaatcccctcctctgctgcaaacgactgttgaaccgagcaaacctc
tet(O)_Y07780	1281	1350	78,3	gcagaatataccatccatagaagtcccgaatccttctggccttctgctgggttgcattagagc

tet(S)_L09756	1509	1578	78,3	ggctatattacagccctgtcagfacgccagcagatttccgaatgcttgcgcctattgtactagagcagg
tet(T)_L42544	214	283	76,5	tcatagatacactgggcacatggattcatagccgaagtggagcgaactctgaaagtgttagatggagc
tet(U)-ORF1_U01917	31	100	75,3	ggcatgcgatggttcaggaaagcttagatagtttgcagcccgcatttttggccattgatataaaacc
tet(X)_M37699	139	208	78,3	gagacaacgaccgagagggcaagaattttggtggaacccttgacctacacaaggttcaggtcaggaagc
tet(Y)_AF121000	91	160	80,0	acatgatcccactgcacgtcggactactgacagcgcctctatgcgatcatgcatttcttggcccccgat
tet_Q_L33696 (tet_Q_L33696, tet_Q_X58717)	72	141	78,3	ttgccagtggagcaacggaaaagtgcggccgtgtggataatggtgacaccataacggactctatggata
tet_W_AJ222769 (tet_W_AJ222769, tet_W_AY049983)	145	214	78,3	agcggcagcgtggattaccattcaagcggcagtcacttccctccagtggcacagatgtaaagttaacat
tetA(33)_AJ420072	648	717	78,3	ttcctattaatcgattcggcctgttcaattcattgggcagcctccaggtgacgtgggtgctgttga
tetA(39)_AY743590	64	133	78,3	ttatgccgatcttgcctgaattattacggctcattggctggagctgaagcagggcgttctactatggtgc
tetA(J)_AF038993	262	331	78,3	tggcttccccactcattatgtagctctacattggacgaataattcgggtataacaggagccactgg
tetA(Y)_AF070999	138	207	78,3	ttatcgctttatcgctttatgcaggtcttttgcgcgccgttttagggcggttatctgaccgctatggac
tetA_L06940	122	191	78,3	gaactacggtgtttattggcgtgtatgcaatgatgcaagtattttgccctctctcggccgctgg
tetA_NC_006388	100	169	78,3	atatcgtccattccgacagcctcagcagcactatggcgtgctgtagcgcctatatcgcttgcatt
tetA_NC_004840	100	169	79,4	atctggttcactcgaacgacgtcaccgccactatggcattctgctggcgtgtatcgcttgcatt
tetA_AJ851089	149	218	78,3	tgcgtaatgcaggttatctttgctccttggcttggaaaaatgctgaccgatttggctggcggccagtg
tetB(P)_L20800	1324	1393	77,7	tgcaggaagactaaatccattttgggcgacagtaggcttagaaatagaaccagcagggagagggcgaagg
tetBSR_D12567	317	386	78,3	cattctagcccatttattcaaggaattggtgcagccgattcccagctctgtgatggtgtcgttgcg
tetD_L06798	246	315	78,3	tttgattacacactgctggcactgtccaatgtgctgtggtgatgttatctcggcggtattatccggga
tetG_AF133139 (tetG_AF133139, tetG_AF133140)	247	316	78,3	tcgattacacgattatggcatcagcggcgtcttatgggtgctgtatattggccgctcatttctggcat
tetH_AJ245947 (tetH_AJ245947, tetH_Y15510)	180	249	78,3	ctaggacgactgctgataaatacggcagaaaaaccatcttgcgttttcccttttaggcgcggcactcg
tetK_U38428	316	385	75,3	tgattttggtaggttagtacaaggagtaggatctgctgacttcccttactgattatggtggttagc
tetL_U17153	319	388	78,3	ttatggctcttttattcaagggctggtgcagctgcattccagcactcgaatggtttagttgctggc
tetV_AF030344	885	954	78,8	tatctcacgaccatgatgctgatggtggctcggctcgctgattccccttgcgatcgtgggatatacatg
luc_D25416	1330	1399	78,3	aaggctatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctgcagcatccgtttattgaagatgcagg
luc_D25416_4	1330	1399	78,3	aaggctatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagcatccgtttatgaagatgcagg
luc_D25416_7	1330	1399	78,3	aaggctatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagcatccatttatgaagatgcagg
luc_D25416_10	1330	1399	78,3	aaagccatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagcatccatttatgaagatacagg
luc_D25416_14	1330	1399	78,3	aaagccatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagtagatccatttatgaaaatacagg
luc_D25416_18	1330	1399	78,3	aaagccatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagtagatccatttatgaaaatacagg
luc_D25416_21	1330	1399	78,3	aaagccatcaagttccgcccggcagtagaagcttactgctacagtagatccatttatgaaaatacaga
gfp_M62653	554	623	78,3	tactccaattggcattggcctgtcctttaccagacaaccattactgtccacacaatctgcccttgc
gfp_M62653_4	554	623	78,3	tactccaattggcaatggcctgtccttaccagacaaccatcacctgtccacacaacctgcccttgc
gfp_M62653_7	554	623	78,3	tactccaattggcaatggcctgtccttaccagataaccatcacctgtccgacaacctgcccttgc
gfp_M62653_10	554	623	78,3	tattctaattggcaatggcctgtccttaccagataaccatcacctgtccgacaacctgcccttgc



gfp_M62653_14	554	623	78,3	tattctaattggcaatgacctgtccttctactagataaacatcacccgtccgcacaacctgtcccttcg
gfp_M62653_18	554	623	78,3	tattctaactggcaatgacctgttcttctactagataaatcatcacccgtccgcataacctgtcccttcg
gfp_M62653_21	554	623	78,3	tattctaactgacaatgacctgttcttctactagataaatcatcacccgccgcataacctgtcccttca
kikA_AY046276	101	170	78,3	caagctcaccggcgatagcggcgggaagcgaagtgaacagtgcctgaagctgcttttcaatcgttaaa
oriV_BR000038	76	145	78,3	caatgacgacgttctcaatgccgaagtcattgccttgcctcggcgaagcgaatcatggatgaaaacag
oriV_NC_001740	112	181	78,3	gcgggggctggcggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatccactaggcgcggttat
trfA_NC_004840	720	789	78,8	ccggttcttcacgttctacgagcttggcaggacttgactggtaacacggctcggactacacaaa
rep_X73674	60	129	78,3	tcgagatctacgatgcgttacctaagtacattgggacaaaagcgtgagcacgaagacctgtccaacgc
repE_AJ851089	51	120	78,3	atcgtccagcaaacgacctactgaggcggcatatagtctctccgggatcaaaaacgtatgctgtatc
AlienMT000016oli	-	-	79,3	agaacaacagctggccgaatggttagttactcagacagctccaacaacattaccgctgctaccctt
AlienMT000017oli	-	-	79,9	tcaacgtcctgtaagttcatgctctcctcaggaggttcagacggtatggatctacaaatcagcagcga
AlienMT000018oli	-	-	79,3	agcgtcgtcatctcgtcataaagacacgctgaatctcatcactgattcagattcaggatcctggtgt
AlienMT000019oli	-	-	78,8	agtggctgtgatgcttgggtgctgcaatgctggtcacaataacttgatttggcgcacatcttctg

\* Die Klammern enthalten Gene, die zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Als Vertreter einer Gruppe dient das Gen, das am besten mit der Consensus-Sequenz des multiplen Alignments der Gene dieser Gruppe übereinstimmt.

Tabelle A2: Resistenzgen-spezifische Primerpaare und deren Charakteristika.

Genname	Primer (Sequenz 5' -> 3')		Schmelztemperatur °C	
	Linker Primer	Rechter Primer	Linker Primer	Rechter Primer
aac(3)-Id_AY458224	ACTGGAAACGATGTTGCGTT	CGATAGCGCCAATGACTTTT	58,35	58,35
aac(6')-Im_AF337947	GACCAATTTATCGGTGAGCC	TCATGTTCGGGAAGTTCCTT	60,4	58,35
aacA_M86913	GTGTAACACGCAAGCACGAT	AGCCTCCGCGATTTTCATAC	60,4	60,16
aacA1_AB113580	AACCTTTGTTTCGGTCTGCT	TCTGTTCCCTAAAGCGATTCCA	58,35	58,66
aacA29b_AY139599	CTCTGGTGGACTTGAGGAGC	GGTCTGTTGATCGATGGCTT	64,5	60,4
aacA4_NC_006352	TGACCTTGCGATGCTCTATG	AAGAGCAACGTACGACTGGG	60,4	62,45
aacA7-AF263520	AGGCCTGTTGAAACTACCGA	CAAACCCTAGTGCTTCTCCG	60,4	62,45
aacC1_AY139604	TCATCAATCCCCTCAAGCAT	AAGTGCATCACTTCTTCCCG	58,35	60,4
aacC2_S68058	GCTAAACTCCGTTACCGCAT	GAGAATGCCGTTTGAATCGT	60,4	58,35
aacC3_X55652	ACAAGAACGTGGTCCGCTAC	AACAGGTAAGCATCCGCATC	62,45	60,4
aacC4_X01385	GAGTTGATGGCAAAGGTTCC	AAGGCTCTTCTCCTTGAGCC	60,4	62,45
aadA10_U37105	ACGGCTCGATGAGAGTGTG	AAGATGCCCGCAAGAATGT	62,32	58
aadA12_AY665771	TCAGAGGTGCTAAGCGTCATT	AGCCGAAGTTTCCAAAAGGT	60,61	58,35
aadA4_AY138986	ATCTTGCGATTTTGCTGACC	TGTACCAAATGCGAGCAAGA	58,35	58,35
aadA7_AY463797	ACAAGCACTCAACGTCATCG	GGAAGCTGAAACCTCCAAGA	60,4	60,4
aadA9_AJ420072	CAAGACAGCTTTCACAGGCA	AAGAAATCGAGCATCAGGGA	60,4	58,35
aadD_AB037420	ATGGGGATGATGTTAAGGCT	TCACTTCCACCTTCCACTCA	58,35	60,4
acrB_M94248	ATATCCTACGATTGCACCGC	GGTACCCGTGGAGTCACTGT	60,4	64,5
acrD_U12598	GGCAATCCTGTTGTGTCTGA	ACATGAGATTATCGAGGCCG	60,4	60,4
ampC_J01611	CCTCTTGCTCCACATTTGCT	ACAACGTTTGCTGTGTGACG	60,4	60,4
aph(2')-Ib_AF337947	TGTAGGTGACCCGATAATGA	CCATAAATGATTTGGTCTATCG	60,61	57,08
aph2_U00004	GATCTGGACGAAGAGCATCA	CGCTATGTCCTGATAGCGGT	60,4	62,45
aphA-3_V01547	GCTGGTGGGAGAAAATGAAA	AAAGTGCAGGACCTTTGGAA	58,35	58,35
aphA-6_X07753	AAAATTGGTCAGTCGCCATC	TTCAAACCTGCTCATCCTGAAAA	58,35	57,08
aphA-7_M29953	TTGGATAACAGAATTGCCGA	CAACTCCACATCTTGCCAAA	56,3	58,35

aphA_NC_006352	GTGATGGGATACAAATGGGC	AACGAAGCTTACAACGGAGG	60,4	60,4
aph_AJ851089	ATTCAACGGGAAACGTCTTG	ACGCTACCTTTGCCATGTTT	58,35	58,35
arr2_AF205943	TTACAAGCAGGTGCAAGGAC	GCTCCATCAAGGCTGAAAAG	60,4	60,4
blaCMY-9_AB061794	CAGTTGATGGAGCAGACCTT	AGCTGGTCTTGATGCCGTAG	62,45	62,45
blaIMP-9_AY033653	TTTAGCGGAGTTAGCTATTGGC	GCCAAGCTTCTAAATTTGCG	60,81	58,35
cat_M11587	AAACCGTAAAGCAAAATGGG	TGAAAATGTTTCGGTCTGTTCA	56,3	57,08
cat_M35190	AGGATATAGACGCTTTTGGTGAA	TCCCAAACGTAAATATCGGC	59,2	58,35
cat_M58515	GATTCCTATTGCCAATTATTACA	TCCCATTCATTTACTATCAAC	55,64	57,42
cat_S48276	GCATGACCGTAAAGCTGGAT	ACATCTCCGTGTCTTTTGG	60,4	60,4
cat2_AY509004	TTTACCCGGATTGACCTGAA	CGGAAACTGATTAACAGCCC	58,35	60,4
catA_AJ851089	TCAGCTGGATATTACGGCCT	GTTTGCTCATGGAAAACGGT	60,4	58,35
catB2_AY139601	GCTTCTGACTGAGCAGGTGA	GAGCAGAAGCTGCCGATAAT	62,45	60,4
catB4_AF322577	AAGGCAAGCTGCTTTCTGAG	GATAAAGGAAGCCCCACTCC	60,4	62,45
catB6_AJ223604	GAGCAAGTGACTAACCGCAA	GCAAAAGCTGCCGATGATTA	60,4	58,35
catB7_AF036933	GCGATGTTCGAGCCCTATG	AGTACACAGCAGTGGCATGG	62,18	62,45
catB8_AF227506	GGGGAACCTTCTTTCTGAGCA	CCCCGCTTCCTATAGAACAA	60,4	60,4
catB9_AF462019	GCATCGCAGTGATTGGATAA	CACTACTGAACGACTGGCGA	58,35	62,45
catIII_X07848	CCGATTATTTTGCACCCATT	TGTTACACAACCTCTGTAGCCGA	56,3	60,99
catP_U15027	TCACACAAATAAAGGAAAAGGGA	ACTCAGTCCAAAGGCTGGAA	57,42	60,4
cat-TC_U75299	CCGAAACATAAAACAAGAAGGA	CAGAAGTCCAAATACCAGAGAA	57,08	58,94
cmlA1_NC_006388	TAGTTGGCGGTACTCCCTTG	GAATTGTGCTCGCTGTTCGTA	62,45	60,4
cmlB_AF034958	TAATTGGCGGTATTCCCTTG	AGCGTAAGCTGAATTGTGCC	58,35	60,4
cmxA_AF024666	CATTTCGAGTCGGTATGGT	ATCCTGCGTTTTCGAGAG	60,16	59,9
cmy-13_AY339625	AAATCGTTATGCTGCGCTCT	GATAATGGCAACGGCCATAC	58,35	60,4
ctx-m26_AY157676	CCATGTGCAGCACCAGTAAA	TCAACTCCCCGAATGTCATC	60,4	60,4
ctx-m27_AY156923	CTGGAGAAAAGCAGCGGAG	TGCTTTTTCGTTTCACTCTG	62,32	58,35
ctx-m32_AJ557142	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	CGCTCATCAGCACGATAAAG	60,4	60,4
ctx-m4_Y14156	GGAGAAAAGTTCGGGAGGTC	GCTTATCGCTCTCGCTCTGT	62,45	62,45
dfr13-dfrXIII_Z50802	AATCGGTCCGCATTTATCTG	TTGGTAAGGGCTTGCCTATG	58,35	60,4
dfr16_AY259085	ACCAGATATTCCATGGAGCG	CCATTACACCCTCATCATTCG	60,4	60,61

dfr17_AY139588	CAGAAAATGGCGTAATCGGT	TGCATATTTGCGATTTGGAA	58,35	54,25
dfrA19_AM234698	TCGCTGTGGATTCTAAGTTGG	CGCCATCCTTTTCTAACTGC	60,61	60,4
dfrB2_DQ839391	AAGTAGCGATGAAGCCAACG	TAAATTTGCACTGAGCCTGG	60,4	58,35
dfrD_Z50141	AATCGGCAAGGATAACGACA	AATGGGCAATTCACAATCC	58,35	56,3
dfrII_AY139601	CAAGAAAGGTCGGAAATGGA	GCAGTACCACCCGACAATCT	58,35	62,45
dfrV_AY139589	AAAAGCGAAAAACGGAGTGA	GTCCAGGCTGAGCGAGTAAC	56,3	64,5
dfrVI_Z86002	CCGAGAATGGAGTAATTGGC	CACAACATCAGGGTCATTCCG	60,4	60,4
dfrXII_AY139605	TTTATCTCGTTGCTGCGATG	AGGCTTGCCGATAGACTCAA	58,35	60,4
dhfr_J03306	CTTTGATTGCAGCTTTGGCT	CATTGGGGATTGCGACTAAC	58,35	60,4
dhfr_Z74777	AAGGACAATCGTCTGCCTTG	ATTACGCGTCAAAATCAGGG	60,4	58,35
dhfrI_NC_006385	ATGGAGTGCCAAAGGTGAAC	TGGAAAGATCACTACGTTCTCA	60,4	58,94
dhfrIX_X57730	TGGCATGAACCAGAAGATT	GCAGTTCCTTACTGCGATCTGG	56,3	62,57
dhfrVIII_U10186	GATCGAGCTTCATGCCATTT	TAATTTGACGGGCAAGCTCT	58,35	58,35
dhfrXV_Z83311	TGCCAAAGGGGAACAATTAC	TCGTCTTCAGATGATTTAGCG	58,35	58,66
effJ-tet(35)_AF353562	GCTTCTAGTTGGGGTGCGTA	CATGTTACGCATCTTACCG	62,45	60,4
ereA2_AF512546	CAGCCTCAAAGCTGGAGTT	ACATTCCAAACCAATCGCAT	60,4	56,3
ereB_X03988	TCTGCATTATGCCAACGGTA	TCTGCTCACTTTGTGGTTTT	58,35	58,66
erm(A)_X03216	ATCGGATCAGGAAAAGGACA	TTTTGGGAAGGAAAATTTTAGA	58,35	53,36
erm(TR)_AF002716	CATCTAAAAAGCATGTAAAGGAA	TTCTGAAAAGGTTCAACTGCTTT	55,64	57,42
ermA_X51472	ATGTCTGCATACGGACACGG	ACTTCAACTGCCGTTATCGC	62,45	60,4
ermB_M11180	AGCCATGCGTCTGACATCTA	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	60,4	62,45
ermD_M29832	AATTGTGGATCGGGCAAATA	TTGAATGCTGTGCCGTTTTA	56,3	56,3
ermF_M14730	TTTTCTGGGAGGTTCCATTG	TTTCCGAAATTGACCTGACC	58,35	58,35
fexA_AJ549214	CCGATTTATGGTCAATCTCA	TGGGAAAACCTTCGAAATTG	58,66	56,3
floR_AF118107	TCGTCACTACGGCCTTTTC	CTTGACTTGATCCAGAGGGC	60,4	62,45
ges-5_AY494717	ACGCACTATTACTGGCAGGG	GTTGAGCACATTGCAAAACG	62,45	58,35
gfp_M62653	CAACATTGAAGATGGAAGCG	CATGCCATGTGTAATCCAG	58,35	60,4
imp-13_AJ550807	AGGAGCGGCTTTACCTGATT	CGCTCCACAAACCAATTGAC	60,4	60,4
imp-16_AJ584652 (1)	TGGAAATCTCGATGATGCAA	TTTTTACTTTCTTTTAGCCCTTT	56,3	53,86
imp-16_AJ584652 (2)	TGGAAATCTCGATGATGCAA	ACTTGGCTGTGATGGTTTTT	56,3	56,3

imp-2_AJ243491	CGGTTTGGTGGTTCTTGTA	ATTCAGATGCATACGTGGGA	58,66	58,35
imp-5_AF290912	GTGGAACGCGGCTATAAAAT	TAGCCAATAGCTAGCTCCGC	58,35	62,45
kikA_AY046276	TTTATCTTCCCTGCCAGCCAT	CCGGGCATTCATTAAGAAAA	58,35	56,3
kpc-3_AF395881	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC	GGCGGCGTTATCACTGTATT	60,4	60,4
luc_D25416	GGGATGGATACACTCTGGTGA	AGATCACCCGCAACTTCATC	62,57	60,4
mecA_AB037671	AAAAAGATGGCAAAGATATTC	TTCTTCGTTACTCATGCCATA	53,86	59,2
mefA_AJ715499	GGAGCTACCTGTCTGGATGG	CAACCGCCGGACTAACAATA	64,5	60,4
mefE_AE008470	AGCCTTTTCTCCGGCATTAT	CCTCTTCAATAGCGTGCTGA	58,35	60,4
mefE_AF274302	CCTGCAAATGGCGATTATTT	AATAGCAAGCACTGCACCAG	56,3	60,4
mel_DQ839391	GGTGATAACGGAGCAGGAAA	GCCACTCATTGTGTCGTTTT	60,4	58,35
mexB_L11616	GACCAAGGCGGTGAAGAAC	AACACCTGGAAGTCACCGAC	62,32	62,45
mexD_NC_003430	GCAGAACCCTTGAAGAAAG	GGATCTCGGGATTGATGTTG	60,4	60,4
mexD_U57969	TCAACGGTCTGGGTA	GTCGATCAACAGGCGCAGT	62,45	62,32
mexF_X99514	GACGTGGTCAACGCCATC	GAAGCTGTGCTTCAGCTCG	62,18	62,32
mexI_AE004837	GATCATCCTGATCACCGTGC	CGTGGAGTTGCAGTTCGTT	62,45	60,16
mexY_AB015853	GCCCTCTACGAAAGCTGGTC	TTCTGGTAATGGTCTTGG	64,5	60,4
mph(A)_NC_006385	AGTTCGTGGTGAACGACAAG	AGTCGATCATCCCGCTGAC	60,4	62,32
mph(B)_AM260957	GATGATCTCATCGCCTACCC	CGGCATCGATACTGAGATTG	62,45	60,4
mph(BM)_AF167161	TCGACATGCGACCATGATAC	TTTCACCTCCAGCTTTACCG	60,4	60,4
mphB_D85892	TGTGCCAGCAGGTACGATAG	CCATACGCTGCTTCATTGAC	62,45	60,4
mph_DQ839391	TGTTGCTTACGGACAAAATGA	TGAAATTCTCCAATCAGGAACC	56,71	58,94
msr(A)_X52085	CAAATGGCACAAGCATCATC	TGTGGTTTTTCAACTTCTTCCA	58,35	57,08
nps-1_NC_006388	TTCTGGCCTGTAGCCTCTGT	TGTTGAGCACCTTGAACGTC	62,45	60,4
nps-2_NC_003430	GGACCATCGTCATCGAGTCT	ATTCGCAATCGAATACTGGG	62,45	58,35
orf11_NC_006385	AGATCGTCTTGTCATTCGCC	GGAACACCGGGTCTATTGAA	60,4	60,4
oriV_BR000038	CGCTTGGGATTCCAGAATAG	TCTACAAAGGCTCGGAATGC	60,4	60,4
oriV_NC_001740	CACGAACCCCTGCAATAACT	GAATAGACCAGCTATCCGGC	60,4	62,45
oxa-10_AY115475	AGAGGCTTTGGTAACGGAGG	TGGATTTTCTTAGCGGCAAC	62,45	58,35
oxa-12_U10251	TACCCGAAGAACTGGATGG	AGTTTCTTGAGTTGCGCGG	60,4	60,16
oxa-18_U85514	CCATGAGCGGAAAAAGACAT	CCAAAGGCAGTTTGAACGTC	58,35	60,4

oxa-1_AY139600	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	CGCATCAAATGCCATAAGTG	62,45	58,35
oxa-20_AF024602	TGAGAGCTCTAATTGGGGGA	AAGGGTATGCGGAATCTTGA	60,4	58,35
oxa-22_AF064820	CTCAAAGATGAGCACACCCC	ACATCCATGTTGCCGTAGC	62,45	60,16
oxa-27_AF201828	TAAATGGAAGGGCGAGAAAA	ACCTGCTGTCCAATTTTCAGC	56,3	60,4
oxa-29_AJ400619	TGATGCATTTCACTATGGCAA	GCTTTGGGATTACGGATAG	56,71	60,4
oxa-2_NC_007502	TCTTCGCGATACTTTTCTCCA	ATCGCACAGGATCAAAAACC	58,66	58,35
oxa-40_AF509241	TGAGATTTTCAAATGGGATGG	TTTCCAAAATTAACCCGCTTT	56,71	54,76
oxa-45_AJ519683	CAATGTCGACGTTCAAGGTG	CAATTGCTGCGAATACCAGA	60,4	58,35
oxa-46_AF317511	ATGGCAATCCGATTCTTCAC	ACGTTCTGTCTGCAATAACGA	58,35	58,35
oxa-48_AY236073	GCGAACCAAGCATTTTTACC	TATGATCGCGATTCCAAGTG	58,35	58,35
oxa-5_X58272	GCACGTGCATCTACAGCCTA	AAACCTGTATAGCGCCCCTT	62,45	60,4
oxa-50_AY306130	CGAACGTACCGGTCTACCA	GGAATGGCAATTCTCCCTG	62,32	60,16
oxa-54_AY500137	CCAATAATCTTAAGCGGGCA	GGCACGACCGAGTATTTTCAT	58,35	60,4
oxa-55_AY343493	TGAGCAGACCAAGGTCAGTG	AGGTGGAAGCCGGAATAAAG	62,45	60,4
oxa-58_AY665723	GCAATTGCCTTTTAAACCTGA	CTGCCTTTTCAACAAAACCC	56,71	58,35
oxa-60_AF525303	GACATGGCGTTACCCGAG	GCTTCTTCGAAAGCGGAAAT	62,18	58,35
oxa-61_AY587956	AAATTTAGTGTTTGGGCAAGA	TCACACCACTATCAAGTGCAA	54,76	58,66
oxa-75_AY859529	CGCTTCCATTTAGCCAAAAA	AAGTTAAGGGAGAACGCTACAA	56,3	58,94
oxa-9_M55547	GCTGCATATGTTGGTGTTCCG	AAAGACGAGCACGGAGACAC	60,4	62,45
per-1_Z21957	ACTGCCTCGACGCTACTGAT	TTTGCATTGGGAATTTTTCA	62,45	52,2
per-2_X93314	GTTTTACCGCTTCTGCTCT	AAACACACTTTGCATCGGAA	60,4	56,3
qacB_AF053771	CACAATGGTTACAGGTTGTGG	AATGGCTGCAGTTCCAATTC	60,61	58,35
qacD_M37888	AGGAACAATAATTTCAATTTGGA	CGAAACTACGCCGACTATGA	53,36	60,4
qacEDelta1_NC_006385	GGCTTTACTAAGCTTGCCCC	CATACCTACAAAGCCCCACG	62,45	62,45
qacF_NC_007502	ATCGTTGCAGAGGTGATCG	ACCCATCAGTGTGATGAGCA	60,16	60,4
qacF_AY139598	TGGCTGTTTCAATCTTTGGC	GCCCATACAGCGTAAGCAAT	58,35	60,4
qacG_Y16944	TTTCGTTTGGAAATTTGCTTTT	TCAATGGCTTTTCTCCAAATACA	52,8	57,08
qacG2_AJ609296	TGGTTATTTCTGGCTACGGC	TTTGAGTGTGACGACAGGA	60,4	60,4
qacH_Y16945	TCTTCAGACGGTTTCTCAAAA	TGTGATGATCCGAATGTGTTT	56,71	56,71
qnr_AB187515	CATATCGGCACCACAATTTT	CGAAGATCTGCGACATCAAA	58,66	58,35

qnrA3_DQ058661	AAGTTTTTCAGCAAGAGGATTTTC	CATAGCTGAAGTGGCACCCCT	57,42	62,45
qnrB1_DQ351241	AAATATGGCTCTGGCACTCG	CTTTCAGCATCGCACGACTA	60,4	60,4
qnrB4_DQ303921	AGTCGCGCTAACCTGAAAGA	GTGCGGGTGGTGATCATATT	60,4	60,4
rep_X73674	CGGCCAAGAAAGACGACTAC	ATGGCTGGTTTCACCTTCAC	62,45	60,4
repE_AJ851089	CGGAAACAGCGGTTATCAAT	TAGCAACATGGATCTCGCAG	58,35	60,4
shv-34_AY036620	GCGTTATTTTCGCCTGTGTA	AGGTGCTCATCATGGGAAAG	58,35	60,4
strA- NC_004840	CTCGATCTTTTGGCTCGTGT	CAATCATGAGTGCCAAATCG	60,4	58,35
strB- NC_004840	GCCTGTTTTTCTGCTCATT	CGCAGTTCATCAGCAATGTC	58,35	60,4
sul3_AY316203	ACCACCGATAGTTTTTCCGA	TGCCTTTTTTCTTTTAAAGCC	58,35	54,25
sulII_AJ851089	GACAGTTATCAACCCGCGAC	GTCTTGCACCGAATGCATAA	62,45	58,35
sulI_NC_006388	GACGAGATTGTGCGGTTCTT	GAGACCAATAGCGGAAGCC	60,4	62,32
TEM-1_AJ851089	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT	GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT	58,35	60,4
tet(30)_AF090987	CTGTTTGTCTGCCGAAAG	CCATAGAGCACCCAGATCGT	60,4	62,45
tet(31)_AJ250203	AATAAGCGGGCGTTGTTAGA	TCCTAAATGGATTTTTGCCG	58,35	56,3
tet(32)_AJ295238	CATTATAGATACGCCAGGCCA	TGTTTCATTTTCTGAAGCGCA	60,61	56,3
tet(34)_AB061440	TGCTGAAAAACAGATGCCAG	TAACCTTCGCCATCACCTTC	58,35	60,4
tet(36)_AJ514254	CGATGGATATCGAAAAACGAA	TTTGAGCTTGAATGCCCTCT	56,71	58,35
tet(37)_AF540889	TTGAAAAGGTGGTGAACCTG	CGCCCCATCCTAAATAAAT	58,35	58,35
tet(38)_AY825285	TTTCTGTAGCCATTGCTGATG	CGCCATAAATAAATAGTGTGCGT	58,66	59,2
tet(M)_M21136	AGTGCACCTGTTGCAAGAAAAG	GAAACCGAGCTCTCATACTGC	58,66	62,57
tet(M)_M85225	AGTGCACCTGTTGCAAGAAAAG	GAAACCGAGCTCTCATACTGC	58,66	62,57
tet(M)_X04388	GCTTATTCCGGGGAAATTGT	CGGGTCACTGTCGGAGATT	58,35	62,32
tet(M)_X90939	GCTTATTCCGGGGAAATTGT	CGGGTCACTGTCGGAGATT	58,35	62,32
tet(O)_Y07780	GTGCCATCCTTGAGGAAAAA	TGCTTTCATACTGCACTCCG	58,35	60,4
tet(S)_L09756	CAAGGATTGTACGGTTGGAAA	TTTCGAAGCTAAGATATGGCTC	58,66	58,94
tet(T)_L42544	AACGGATTCGATGGAACCTG	GGACTTGAATTCCTTCTTTTGC	58,35	58,94
tet(U)-ORF1_U01917	GCAGCTAAGACGTGGCAAA	TGCTTCAGCAAATTCGATA	60,16	56,3
tet(X)_M37699	CGTTGGACTGACTATGGCAA	CCCATTGGTAAGGCTAAGTCA	60,4	60,61
tet(Y)_AF121000	CCGATCTTGCCTACCCCTTCT	GTCCGAAACGGTCAGAGAGT	62,45	62,45
tet_Q_L33696	GCTCACATTGATGCAGGAAA	CGTAGAAGCCCGGACAGTAA	58,35	62,45

tet_W_AJ222769	GTCGAAAAAGGGACAACGAG	CTAAAACAGCCAAAGAGCGG	60,4	60,4
tetA(33)_AJ420072	AGACCCGTCCTGATTCCC	AGATTCCAACCTTCGACGGG	62,18	60,16
tetA(39)_AY743590	TATTTCTGGATGCTGTTGGG	GCTCCAAGGATAGGTGCAAA	58,35	60,4
tetA(J)_AF038993	TATTGGGTGCCGCATTAGAT	TAAACCCACACCAAATGCAC	58,35	58,35
tetA(Y)_AF070999	GCAGAGCAAACAGCATTTCA	TCAATCGTGGCACCTAAAAA	58,35	56,3
tetA_L06940	GGGAGTTTGTGGAAAGGCT	TGCCATTAATGCGTAGTCCA	60,4	58,35
tetA_NC_004840	CCTGATTATGCCGGTGCT	TGGCGTAGTCGACAGCAG	59,9	62,18
tetA_NC_006388	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	GCGTAGTCGATAGTGGCTCC	62,45	64,5
tetA_AJ851089	TTGCTTCGGAAGATATCGCT	ATCCAAAGCGCACTTGAAAA	58,35	56,3
tetB(P)_L20800	CACCTAAAGGTTTTGGAGCG	TGGCAATGACCCTACTGAAA	60,4	58,35
tetBSR_D12567	GCTTAGGGTTCGATCATTGGA	AAATGCTTTCCCCCTGTTCT	60,4	58,35
tetD_L06798	AGACCGGTGCTGCTGTTATC	GTGCTGTCCGCCACTACC	62,45	64,46
tetG_AF133139	GGTGCTTCTGGCTTCTCTTG	CAATGGTTGAGGCAGCTACA	62,45	60,4
tetH_AJ245947	CAACCCATTACGGTGTGCTA	AAGTGTGGTTGAGAATGCCA	60,4	58,35
tetK_U38428	TTGAGCTGTCTTGGTTCATTG	AAAGGCTTTGCCTTGTTTTT	58,66	54,25
tetL_U17153	TCGGTAATTGGGTTTGTGG	CCCATGGCTACTATCGATCC	58,35	62,45
tetV_AF030344	ATCCTGGCGTTCTTCGGTAT	GTGACGCCGATGACGAAC	60,4	62,18
tla-1_AF148067	GACGCTACCGTTCAGCTCTT	GTGGCAGCAGTAATGCCTTT	62,45	60,4
tla-2_NC_006385	TCGTGCTTGCTGTTTTGAAC	CGTTGTTGTCGCTTTGAGTG	58,35	60,4
trfA_NC_004840	GACGACGAGCTGGTATTCG	GATGCGTTGGGATGAGAACT	62,32	60,4
veb-1_AF010416	CGATTGCTTTAGCCGTTTTG	CAACCAATATTGTCGCTCTCTG	58,35	60,81
vgb(B)_AF015628	CGGATAACGCACTTTGGTTC	TTCGACCTATTTTGTTGCC	60,4	58,35
vgh(A)_M20129	TCTGGGGGAAATTACCGAAT	AACAAATGCCATGTGGTTCA	58,35	56,3
vim-4_AY509609	TCCGACTTTACCAGATTGCC	TTTCAATCTCCGCGAGAAGT	60,4	58,35
vim-7_AJ536835	CGCAGCTTTCTGGTTGGTAT	CGTGTACCCGAGTTTCTGAG	60,4	62,45



Table A3: Mittels PCR detektierte Resistenzgene in Gesamt-Plasmid-DNA aus Belebtschlamm Bakterien.

Name *	Gene Product	Amplicon size [bp]	Resistance to / Function #	Accession No.
<i>aacA, aadB</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase	197	Km, Tob, Ak	M86913
<i>aacA1</i>	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase	200	Gm, Km, Tob, Neo	AB113580
<i>aacA4</i>	aminoglycoside 6'-acetyltransferase	196	Ak	AJ744860
<i>aacA7</i>	aminoglycoside acetyltransferase-6' type I	175	Gm, Tob, Km	AF263520
<i>aacA29b</i>	aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase	170	Ak, Km	AY139599
<i>aacC1</i>	aminoglycoside-3N-acetyltransferase	130	Gm	AY139604
<i>aacC2, aacC3</i>	aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase	148	Gm	S68058
<i>aacC4</i>	aminoglycoside-(3)-acetyltransferase IV	147	Gm	X01385
<i>aac(3)-Id</i>	3'-N-aminoglycoside acetyltransferase	178	Gm	AY458224
<i>aac(6')-Im</i>	6'-aminoglycoside N-acetyltransferase	194	Tob, Ak, Km	AF337947
<i>aadA4, aadA5</i>	streptomycin 3"-adenylyltransferase	198	Sm, Sp	AY138986
<i>aadA7</i>	aminoglycoside (3'')(9) adenylyltransferase	187	Sm, Sp	AY463797
<i>aadA9</i>	streptomycin 3"-adenylyltransferase	184	Sm, Sp	AJ420072
<i>aadA10, aadA6/aadA10</i>	aminoglycoside (3'')(9) adenylyltransferase	198	Sm, Sp	U37105
<i>aadA12, aadA1, aadA2, aadA8, aadA11, aadA13, aadA23</i>	Put. streptomycin 3"-adenylyltransferase	186	putative Sm, Sp	AY665771
<i>aadD</i>	kanamycin-nucleotidyltransferase	153	Km	AB037420
<i>aph</i>	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	173	Km, Neo	AJ851089
<i>aphA</i>	3'-aminoglycoside phosphotransferase	198	Km	AJ744860
<i>aphA-3</i>	3'5"-aminoglycoside phosphotransferase of type III	139	Km	V01547
<i>aphA-6</i>	3'-aminoglycoside phosphotransferase	192	Km, Ak	X07753
<i>aph2</i>	aminoglycoside-3'-O-phosphotransferase	198	Km, Neo	U00004
<i>aph(2')-Ib</i>	aminoglycoside phosphotransferase	175	Km	AF337947
<i>strA</i>	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	196	Sm	NC_004840
<i>strB</i>	aminoglycoside-6-phosphotransferase	150	Sm	NC_004840
<i>ctx-m4</i>	class A $\beta$ -lactamase	155	Amp, Ctx, Cxm, Atm	Y14156
<i>ctx-m27</i>	class A $\beta$ -lactamase	158	Caz, Ctx, Amo, Tic, Prl, Kf, Cxm, Cpo, Atm	AY156923
<i>ctx-m32</i>	class A $\beta$ -lactamase	156	Amo, Ctx, Caz, Fep, Prl, Kf, Fox, Cxm	AJ557142
<i>ges-3</i>	class A extended spectrum $\beta$ -lactamase	181	Titeracillin, Prl, CAZ, CTX, Atm, Ipm	AY494717

<i>per-2</i>	class A extended spectrum $\beta$ -lactamase	198	Oxyiminocephalosporines, Atm, Cft	X93314
<i>shv-34</i>	class A $\beta$ -lactamase	200	CAZ, CTX	AY036620
<i>tem-1</i>	class A $\beta$ -lactamase	167	Amp, Pen-G	AJ851089
<i>tla-2</i>	class A extended spectrum $\beta$ -lactamase	186	Amo, Tic, Caz, Kf, Cxm, Fox, Ctx, Fep, Atm	NC_006385
<i>veb-1</i>	class A extended spectrum $\beta$ -lactamase	190	cephalosporines, Atm	AF010416
<i>imp-2, imp-5</i>	class B metallo $\beta$ -lactamase	200	Amp, CTX, Fep	AJ243491
<i>imp-9, imp-11</i>	class B metallo $\beta$ -lactamase	178	$\beta$ -lactams	AY033653
<i>imp-13, imp-2</i>	class B metallo $\beta$ -lactamase	198	Cxm, Caz, Ctx, Cro, Fep, Amp	AJ550807
<i>ampC</i>	class C $\beta$ -lactamase, cephalosporinase	189	Pen, cephalosporines	J01611
<i>cmy-9, cmy-10</i>	class C $\beta$ -lactamase	169	$\beta$ -lactams	AB061794
<i>cmy-13, cmy-5</i>	class C $\beta$ -lactamase	150	$\beta$ -lactams	AY339625
<i>bla<sub>NPS-1</sub></i>	class D $\beta$ -lactamase	188	Amo, azlocillin, Cec, cefazolin, Cfp, Prl	NC_003430
<i>bla<sub>NPS-2</sub></i>	class D $\beta$ -lactamase	192	Amp	NC_006388
<i>oxa-1</i>	class D $\beta$ -lactamase	199	$\beta$ -lactams	AY139600
<i>oxa-2, oxa-21, oxa-53</i>	class D $\beta$ -lactamase	177	$\beta$ -lactams	NC_007502
<i>oxa-5</i>	class D $\beta$ -lactamase	175	$\beta$ -lactams	X58272
<i>oxa-9</i>	class D $\beta$ -lactamase	162	$\beta$ -lactams	M55547
<i>oxa-10, oxa-56</i>	class D $\beta$ -lactamase	191	$\beta$ -lactams	AY115475
<i>oxa-12</i>	class D $\beta$ -lactamase	188	$\beta$ -lactams	U10251
<i>oxa-22</i>	class D $\beta$ -lactamase	200	benzylpenicillin, Ob	AF064820
<i>oxa-27</i>	class D $\beta$ -lactamase	180	$\beta$ -lactams	AF201828
<i>oxa-40</i>	class D $\beta$ -lactamase	168	Amo, Tic, Caz, Fep, Cpo, Prl, Kf, Cxm, Ipm	AF509241
<i>oxa-46, oxa</i>	class D $\beta$ -lactamase	150	Amp, Car, Mez, Kf	AF317511
<i>oxa-48</i>	class D $\beta$ -lactamase	145	Amo, Tic, Fep, Ipm, Cpo, Prl, Ctx	AY236073
<i>oxa-50</i>	class D $\beta$ -lactamase	198	Amp, Tic, Ctx, Prl, Kf, Cxm	AY306130
<i>oxa-58</i>	class D $\beta$ -lactamase	152	Amo, Tic, Cpo, Prl, Ipm, Kf	AY665723
<i>oxa-75</i>	class D $\beta$ -lactamase	181	Amp, Prl	AY859529
<i>cmlA1, cmlA5</i>	chloramphenicol efflux protein	137	Cm	NC_006388
<i>cmlB</i>	hydrophobic polypeptid	147	Cm	AF034958
<i>cmxA</i>	chloramphenicol export protein	186	Cm	AF024666
<i>fexA</i>	florfenicol/chloramphenicol exporter	198	Cm, Ffc	AJ549214

<i>floR, cmlA</i>	efflux protein	188	Cm, Ffc	AF118107
<i>cat</i>	chloramphenicol acetyltransferase	173	Cm	M11587
<i>cat</i>	chloramphenicol acetyltransferase	162	Cm	M35190
<i>cat</i>	chloramphenicol acetyltransferase	195	Cm	S48276
<i>cat</i>	chloramphenicol acetyltransferase	163	Cm	M58515
<i>cat2, catII, cmlA</i>	chloramphenicol acetyltransferase	192	Cm	AY509004
<i>catIII</i>	chloramphenicol acetyltransferase	150	Cm	X07848
<i>catA</i>	chloramphenicol acetyltransferase	186	Cm	AJ851089
<i>catB2</i>	chloramphenicol acetyltransferase	156	Cm	AY139601
<i>catB4</i>	chloramphenicol acetyltransferase	188	Cm	AF322577
<i>catB7</i>	chloramphenicol acetyltransferase	152	Cm	AF036933
<i>catB8</i>	chloramphenicol acetyltransferase	175	Cm	AF227506
<i>cat-TC, cat</i>	chloramphenicol acetyltransferase	194	Cm	U75299
<i>qnrA3, qnr</i>	pentapeptide family, DNA-gyrase and topoisomerase IV protection	168	Nal	DQ058661
<i>qnrB1, qnrB2, qnrB5</i>	pentapeptide family, DNA-gyrase and topoisomerase IV protection	191	Cip	DQ351241
<i>qnrB4</i>	pentapeptide family	158	quinolones	DQ303921
<i>qnr, qnrS2</i>	quinolon resistance determinant	175	Cip, Nor, Nal	AB187515
<i>ere(A2), ereA</i>	erythromycin esterase type I	177	Em	AF512546
<i>ereB</i>	erythromycin esterase type II	158	Em	X03988
<i>mph(B)</i>	macrolide phosphotransferase	199	Azi, Cla, Em, Rox, Tyl	AM260957
<i>mph(A)</i>	macrolide 2'-phosphotransferase I	153	Azi, Cla, Em, Rox	NC_006385
<i>mph</i>	macrolide 2'-phosphotransferase	200	Em	DQ839391
<i>mph(B)</i>	macrolide 2'-phosphotransferase II	200	macrolides	D85892
<i>mph(BM)</i>	macrolide 2'-phosphotransferase II	200	macrolides	AF167161
<i>erm(A)</i>	rRNA adenin N-6-methyltransferase	185	Em	X51472
<i>erm(B)</i>	rRNA adenin N-6-methyltransferase	193	Em	M11180
<i>erm(F)</i>	rRNA adenin N-6-methyltransferase	323	macrolide-lincosamide-streptogramin B	M14730
<i>mef(A)</i>	macrolide-efflux protein, MFS permease	179	Em	AJ715499
<i>mef(E), mef(I)</i>	macrolide-efflux protein, MFS permease	199	Em	AF274302
<i>mel</i>	macrolide efflux protein, macrolide-specific ABC-type efflux carrier	198	Azi, Cla, Em	DQ839391
<i>msr(A)</i>	erythromycin resistance ATP-binding protein MsrA	158	Em	X52085
<i>arr2</i>	put. rifampin ADP-ribosyl transferase	140	Rif	AF205943
<i>sulI</i>	dihydropteroate synthetase	185	Sul	NC_006388
<i>sulII</i>	dihydropteroate synthetase	147	Sul	AJ851089
<i>sulIII</i>	dihydropteroate synthetase	199	Sul	AY316203
<i>dfrII</i>	dihydrofolate reductase	156	Tp	AY139601

<i>dfrV</i>	dihydrofolate reductase	180	Tp	AY139589
<i>dfr13 = dfrXIII</i>	dihydrofolate reductase	174	Tp	Z50802
<i>dfr16</i>	dihydrofolate reductase	173	Tp	AY259085
<i>dfr17, dfrVII</i>	dihydrofolate reductase	152	Tp	AY139588
<i>dfrA19</i>	dihydrofolate reductase	165	Tp	AM234698
<i>dfrB2</i>	dihydrofolate reductase	198	Tp	AY139592
<i>dfrD</i>	dihydrofolate reductase	194	Tp	Z50141
<i>dhfr1</i>	dihydrofolate reductase	169	Tp	AJ698325
<i>dhfrVIII</i>	dihydrofolate reductase	169	Tp	U10186
<i>dhfrXV</i>	dihydrofolate reductase	197	Tp	Z83311
<i>tet(A)</i>	MFS tetracycline efflux	200	Tc	NC_004840
<i>tet(A)</i>	MFS tetracycline efflux	198	Tc	NC_006388
<i>tetA(C)</i>	MFS tetracycline efflux	187	Tc	AJ851089
<i>tetA(E)</i>	MFS tetracycline efflux	176	Tc	L06940
<i>tet(D)</i>	MFS tetracycline efflux	155	Tc	L06798
<i>tet(G)</i>	MFS tetracycline efflux	140	Tc	AF133139
<i>tet(H)</i>	MFS tetracycline efflux	164	Tc	AJ245947
<i>tet(L)</i>	MFS tetracycline efflux	176	Tc	U17153
<i>tet(Y)</i>	MFS tetracycline efflux	146	Tc	AF070999
<i>tet(39)</i>	MFS tetracycline efflux	154	Tc	AY743590
<i>tet(U)</i>	replication	198	Low level Tc	U01917
<i>tet(X)</i>	inactivation of tetracycline	186	Tc	M37699
<i>tetB(P)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	143	Tc	L20800
<i>tet(M)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	197	Tc	M21136
<i>tet(M)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	197	Tc	M85225
<i>tet(M)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	198	Tc	X04388
<i>tet(M)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	198	Tc	X90939
<i>tet(O)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	189	Tc	Y07780
<i>tet(S)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	172	Tc	L09756
<i>tet(32)</i>	GTP-binding elongation factor protein, TetM/TetO family	149	Tc	AJ295238
<i>tetR(31)</i>	tetracycline repressor protein	168	regulates expression of TetA(31)	AJ250203
<i>qacB</i>	permease of the MFS family, multidrug efflux protein	164	multidrug efflux	AF053771
<i>qacEΔ1</i>	small multidrug resistance protein, membrane transporter of cations and cationic drugs	198	quaternary ammonium compounds	AJ698325
<i>qacF</i>	small multidrug resistance protein, membrane transporter of cations and cationic drugs	195	quaternary ammonium compounds	NC_007502

<i>qacF, qacH</i>	small multidrug resistance protein, membrane transporter of cations and cationic drugs	172	quaternary ammonium compounds	AY139598
<i>qacG2</i>	small multidrug resistance protein, membrane transporter of cations and cationic drugs	147	quaternary ammonium compounds	AJ609296
<i>acrB</i>	RND family, acridine/multidrug efflux pump	160	multidrug efflux	M94248
<i>acrD</i>	cation/multidrug efflux pump	185	aminoglycosides, Nv	U12598
<i>mexB</i>	cation/multidrug efflux pump, RND multidrug efflux transporter	147	multidrug efflux	L11616
<i>mexD</i>	RND multidrug efflux transporter	185	Em, Rox	NC_003430
<i>mexD</i>	cation/multidrug efflux pump, RND multidrug efflux transporter	182	multidrug efflux	U57969
<i>mexF</i>	cation/multidrug efflux pump, RND multidrug efflux transporter	348	multidrug efflux	X99514
<i>mexI</i>	cation/multidrug efflux pump, RND multidrug efflux transporter	170	multidrug efflux	AE004837
<i>mexY</i>	cation/multidrug efflux pump, RND multidrug efflux transporter	198	multidrug efflux	AB015853
<i>orf11</i>	ABC type permease	198	Nal, Nor	NC_006385
<i>rep</i>	replication initiation protein	163	IncA/C-specific gene	X73674
<i>repE</i>	replication initiation protein	192	IncFIA-specific replication gene	AJ851089
<i>kikA</i>	killing in <i>Klebsiella</i>	198	IncN-specific gene	AY046276
<i>trfA</i>	replication initiation protein	192	initiation of replication, IncP-specific gene	NC_004840
<i>oriV</i>	origin of the vegetative replication	192	IncQ-specific region	NC_001740

\* The PCR product is specific for all genes given in the field

# Abbreviations: Ak - amikacin; Amo - amoxicillin; Amp - ampicillin; Atm - aztreonam; Azm - azithromycin; Car - carbenicillin; Caz - ceftazidim; Cec - cefaclor; Cfp – cefoperazon; Cft - ceftibuten; Cip - ciprofloxacin; Clr - clarithromycin; Cm - chloramphenicol; Cpo - cefpirom; Cro - ceftriaxon; Ctx - cefotaxim; Cxm - cefuroxim; Em - erythromycin; Fep - cefepim; Ffc - florfenicol; Fox - cefoxitin; Gm - gentamicin; Ipm - imipenem; Kf - cephalothin; Km - kanamycin; Lev - levofloxacin; Met - methicillin; Mez - mezlocillin; Nal – nalidixic acid; Neo - neomycin; Nor - norfloxacin; Nv - novobiocin; Ob – cloxacillin; Ofx - ofloxacin; Pen-G – penicillin G; Prl - piperacillin; Rif - rifampicin; Rox - roxithromycin; Spar - sparfloxacin; Sm - streptomycin; Sp - spectinomycin ; Sul - sulfonamides; Tc - tetracyclines; Tic - ticarcillin; Tob - tobramycin; Tp - trimethoprim; Ty - tylosin.

### 14.3 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

aa-dUTP	Aminoallyl-Desoxyuraciltriphosphat
Array	Zusammenstellung von Ziel-Sequenzen für ein Hybridisierungsexperiment auf einem Trägermaterial
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
<i>gfp</i>	Gen für das grün fluoreszierende Protein
Grid	Ein Sektor auf dem Slide
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
Microarray	Array mit einer hohen Dichte an Zielsequenzen
Multiplex-PCR	PCR zur gleichzeitigen Amplifikation mehrerer Ziel-DNAs
nm	Nanometer
Oligonukleotid	einzelsträngiges DNA-Molekül, das aus ca. 15 bis 100 Nukleotiden besteht
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> – Polymerase Kettenreaktion
Primer	Oligonukleotid als Startermolekül in einer PCR-Reaktion
Slide	Träger, an welchen die Oligonukleotide gebunden werden (hier Glasobjektträger)
Superstructure	Kunststoffmaske, die auf den Slide aufgeklebt wird und eine Trennung der Grids ermöglicht
Template	Kopiervorlage
z.B.	zum Beispiel