

Aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene
sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim

Eingereicht über das Institut für Tier- und Umwelthygiene
der FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
Fachbereich Veterinärmedizin

Die Vereinfachung des Nachweises des Kapsel- und Toxinplasmids von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Silke Pocivalsek
Tierärztin aus Neukirchen- Vluyn
Berlin 2000
Journal- Nr. 2401

<u>1 EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
<u>2 LITERATUR.....</u>	<u>3</u>
<u>2.1 BACILLUS ANTHRACIS</u>	<u>3</u>
<u>2.2 DIAGNOSTIK VON BACILLUS ANTHRACIS</u>	<u>4</u>
<u>2.2.1 KONVENTIONELLE VERFAHREN</u>	<u>4</u>
<u>2.2.2 IMMUNOLOGISCHE UND SEROLOGISCHE VERFAHREN</u>	<u>6</u>
<u>2.2.3 MOLEKULARE VERFAHREN</u>	<u>8</u>
<u>2.3 NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN AUS KLINISCHEN PROBEN, SOWIE UMWELT- UND LEBENSMITTELPROBEN MIT HILFE DER POLYMERASEKETTENREAKTION.....</u>	<u>9</u>
<u>2.4 ISOLIERUNG VON DESOXYNUKLEINSÄURE (DNA).....</u>	<u>11</u>
<u>2.4.1 LYSE</u>	<u>12</u>
<u>2.4.2 ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER DNA.....</u>	<u>14</u>
<u>2.4.3 QUALITÄTSKONTROLLE DER DNA</u>	<u>16</u>
<u>2.5 POLYMERASE- KETTENREAKTION (PCR).....</u>	<u>16</u>
<u>2.5.1 GRUNDLAGEN DER PCR</u>	<u>17</u>
<u>2.5.2 ANWENDUNG DER PCR</u>	<u>17</u>
<u>2.5.3 FAKTOREN, DIE DIE PCR BEEINFLUSSEN.....</u>	<u>18</u>
<u>2.5.3.1 Temperatur</u>	<u>18</u>
<u>2.5.3.2 Reaktionskomponenten.....</u>	<u>19</u>
<u>2.5.3.3 Primer</u>	<u>20</u>
<u>2.5.3.4 Ziel- DNA</u>	<u>21</u>
<u>2.6 AUFTRETEN VON KONTAMINATIONEN</u>	<u>22</u>
<u>2.7 NACHWEIS VON PCR PRODUKTEN IN MIKROTESTPLATTEN.....</u>	<u>25</u>
<u>2.8 FESTLEGEN DES CUT- OFF</u>	<u>30</u>
<u>3 MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>31</u>
<u>3.1 MATERIAL.....</u>	<u>31</u>
<u>3.1.1 EASY- DNA™ KIT</u>	<u>31</u>
<u>3.1.2 PUREGENE DNA ISOLATION KIT</u>	<u>31</u>
<u>3.1.3 DYNAL DYNABEADS DNA DIRECT™ KIT</u>	<u>31</u>
<u>3.1.3.1 Prinzip des Dynal Dynabeads DNA Direct Kit</u>	<u>31</u>
<u>3.1.4 QIAQUICK SPIN PCR PURIFICATION KIT</u>	<u>32</u>
<u>3.1.5 PCR DIG DETECTION KIT</u>	<u>32</u>
<u>3.1.5.1 Schema über den Ablauf des PCR Dig Detection Kit</u>	<u>32</u>
<u>3.1.5.2 Versuchsprinzip des PCR Dig Detection Kit.....</u>	<u>33</u>
<u>3.1.6 VARIATION DES PCR DIG DETECTION KIT MIT DEM CHEMILUMINESZENZSUBSTRAT CSPD</u>	<u>33</u>
<u>3.1.6.1 Schema und Versuchsprinzip der Variation des PCR Dig Detection Kits mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD.....</u>	<u>34</u>
<u>3.1.7 VARIATION DES PCR DIG DETECTION KITS MIT DEM FLUORESZENZSUBSTRAT METHYLUMBELLIFERYLPHOSPHAT.....</u>	<u>34</u>
<u>3.1.7.1 Schema und Versuchsprinzip der Variation des PCR Dig Detection Kits mit dem Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylphosphat</u>	<u>35</u>
<u>3.1.8 PCR ELISA MIT KOVALENTEN, DURCH EINE PHOSPHORAMIDBINDUNG AN DIE MIKROTESTPLATTE GEBUNDENEN FÄNGERSONDEN.....</u>	<u>35</u>
<u>3.1.8.1 Schema des Platzhalters (Spacerarmes), der aus der Oberfläche der Mikrotestplatte herausragt und an den die Fängersonden binden</u>	<u>35</u>
<u>3.1.8.2 Schema und Versuchsprinzip des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatte gebundenen Fängersonden</u>	<u>35</u>

<u>3.1.9 AMPLIQ ALS TESTKIT ZUR ENZYMATISCHEN INTENSIVIERUNG DER FARBENTWICKLUNG DES PCR ELISA</u>	36
<u>3.1.9.1 Schema über den Ablauf des AmpliQ</u>	36
<u>3.1.9.2 Prinzip der Signalverstärkung mit dem AmpliQ</u>	36
<u>3.1.11 LISTE DER VERWENDETEN STÄMME</u>	37
3.2 METHODEN	38
<u>3.2.1 ANREICHERUNG UND ANSCHLIEBENDES ABTÖTEN VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> AUS ERDPROBEN</u>	38
<u>3.2.2 ANREICHERUNG UND ANSCHLIEBENDES ABTÖTEN VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> ALS REINKULTUR</u>	39
<u>3.2.3 DNA PRÄPARATION MIT DEM EASY DNA™ KIT</u>	40
<u>3.2.4 DNA PRÄPARATION MIT DEM PUREGENE DNA ISOLATION KIT</u>	41
<u>3.2.5 VORSCHRIFT ZUR DURCHFÜHRUNG DES DYNAL DYNABEADS DNA DIRECT™ KIT</u>	42
<u>3.2.6 ÜBERPRÜFUNG DER QUALITÄT DER MIT DEM EASY DNA™ KIT, DEM PUREGENE DNA ISOLATION KIT UND DEM DYNAL DYNABEADS DNA DIRECT™ KIT PRÄPARIERTEN DNA-LÖSUNGEN;</u>	42
<u>3.2.7 REINIGUNG DER DNA MIT DEM QIAQUICK SPIN PCR PURIFICATION KIT</u>	43
<u>3.2.8 POLYMERASE- KETTENREAKTION (PCR) FÜR DEN NACHWEIS VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i></u>	44
<u>3.2.8.1 Übersicht über die verwendeten Primer</u>	44
<u>3.2.8.2 Methode zur Durchführung der PCR</u>	46
<u>3.2.8.3 Beschreibung der nested PCR und der seminested PCR für den Nachweis von <i>Bacillus anthracis</i></u>	47
<u>3.2.9 EINSATZ DES ENZYMS URACIL- DNA GLYKOSYLASE ZUR VERMEIDUNG VON CARRY- OVER KONTAMINATIONEN</u>	48
<u>3.2.10 DURCHFÜHRUNG DES POLYMERASE- KETTENREAKTION ENZYME- LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY (PCR ELISA) FÜR DEN NACHWEIS VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i></u>	50
<u>3.2.10.1 Vorschrift zur Durchführung des PCR Dig Detection Kit der Fa. Boehringer</u>	51
<u>3.2.10.2 Vorschrift zur Durchführung eines Vergleiches zwischen dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD und dem PCR Dig Detection Kit</u>	53
<u>3.2.10.3 Vorschrift 1 zur Durchführung des PCR ELISA mit einem Fluoreszenzsubstrat</u>	54
<u>3.2.10.4 Durchführung eines PCR ELISA mit kovalent an die Mikrotestplatte gebundenen Sonden</u>	56
<u>3.2.10.5 Steigerung der Sensitivität des PCR ELISA durch den Testkit AmpliQ</u>	60
<u>3.2.10.6 Steigerung der Sensitivität des PCR ELISA durch Erhöhung der MgCl₂- Konzentration im Prämix der PCR</u>	61
<u>3.2.11 NACHWEIS VON CA. 4 SPOREN VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> IN 100G ERDE</u>	61
<u>3.2.12 UNTERSUCHUNG ÜBER DAS VORKOMMEN VON MIKROORGANISMEN IN ERDPROBEN, DIE EIN FALSCH POSITIVES ERGEBNIS DER PCR (BZW. DES PCR ELISA) FÜR DEN NACHWEIS VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> VERURSACHEN</u>	62
<u>3.2.13 SPALTUNG DER PRODUKTE DER NESTED PCR AUS ERDPROBEN, DIE FÜR DEN NACHWEIS VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> POSITIV SIND, MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN</u>	63
<u>3.2.14 SEQUENZIERUNG DER PRODUKTE DER NESTED PCR FÜR DEN NACHWEIS VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> AUS ERDPROBEN</u>	64
<u>3.2.15 KONTROLLE DER SPEZIFITÄT DER ÜBRIGEN PRIMER, DIE BISHER FÜR DEN NACHWEIS DES PLASMIDS pXO2 BESCHRIEBEN WURDEN</u>	64
<u>3.2.16 SUCHE NACH PRIMERN, DIE SPEZIFISCH FÜR DEN NACHWEIS DES PLASMIDS pXO2 UND FÜR DAS CHROMOSOM VON <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> SIND</u>	65
4 ERGEBNISSE	67
4.1 ERGEBNISSE DER DNS- ISOLIERUNG	67
4.2 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG ÜBER DIE REINIGUNG VON DNA- LÖSUNGEN MIT DEM QUIA QUICK PCR SPIN PURIFICATION KIT	70

<u>4.3. ERGEBNIS DES EINSATZES DER URACIL- DNA GLYKOSYLASE ZUR VERMEIDUNG VON CARRY- OVER KONTAMINATIONEN</u>	72
<u>4.4 ERGEBNISSE DES PCR DIG DETECTION KIT FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS</u>	74
<u>4.5 ERGEBNISSE DES VERGLEICHS ZWISCHEN DEM PCR DIG DETECTION KIT UND DEM PCR ELISA MIT DEM CHEMILUMINESZENZSUBSTRAT CSPD</u>	79
<u>4.6 ERGEBNISSE DES PCR ELISA MIT DEM FLUORESCENZSUBSTRAT FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS</u>	80
<u>4.7 ERGEBNISSE DES PCR ELISA MIT KOVALENT AN DIE MIKROTESTPLATTE GEBUNDENEN SONDEN</u>	85
<u>4.8 BESTIMMUNG DER NACHWEISGRENZE DES PCR ELISA, DER MIT DEM TESTKIT AMPLIQ VERSTÄRKT WIRD</u>	88
<u>4.9 ERGEBNISSE DER STEIGERUNG DER SENSITIVITÄT DES PCR ELISA DURCH ERHÖHUNG DER MgCl₂- KONZENTRATION IM PRÄMIX DER PCR</u>	89
<u>4.10 ERGEBNIS DES NACHWEISES VON CA. 4 SPOREN VON BACILLUS ANTHRACIS PRO 100 G ERDE</u>	90
<u>4.11 ERGEBNIS DER UNTERSUCHUNG ÜBER DAS VORKOMMEN VON MIKROORGANISMEN IN ERDPROBEN, DIE EIN FALSCH POSITIVES ERGEBNIS DER PCR (BZW. DES PCR ELISA) FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS VERURSACHEN</u>	91
<u>4.12 ERGEBNISSE DER SPALTUNG DER PRODUKTE DER NESTED PCR AUS ERDPROBEN, DIE FÜR DEN NACHWEIS DES PLASMIDS pXO2 POSITIV SIND</u>	93
<u>4.13 ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG DER PRODUKTE DER NESTED PCR AUS ERDPROBEN</u> 95	
<u>4.14 ERGEBNISSE DER SPEZIFITÄTSKONTROLLE DER ÜBRIGEN PRIMER, DIE BISHER FÜR DEN NACHWEIS DES PLASMIDS pXO2 BESCHRIEBEN WURDEN</u>	98
<u>4.15 ERGEBNIS DER SUCHE NACH PRIMERN, DIE SPEZIFISCH SIND FÜR DEN NACHWEIS DES PLASMIDS pXO2 UND FÜR DAS CHROMOSOM VON BACILLUS ANTHRACIS</u>	101
<u>5. DISKUSSION</u>	105
<u>5.1 ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS AUS BODENPROBEN</u>	105
<u>5.2 VOR- UND NACHTEILE DER DNA GEWINNUNGSMETHODEN</u>	105
<u>5.3 DISKUSSION DER OPTIMALEN BEDINGUNGEN FÜR DIE PCR FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS AUS BODENPROBEN MIT DEM PCR ELISA</u>	106
<u>5.4 VOR- UND NACHTEILE DES PCR ELISA GEGENÜBER DER NESTED PCR</u>	108
<u>5.5 GRUNDSÄTZLICHE ANFORDERUNGEN AN DEN PCR ELISA FÜR EINEN MÖGLICHSST SENSITIVEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS</u>	109
<u>5.6 DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES NACHWEISES VON BACILLUS ANTHRACIS MIT DEM PCR ELISA</u>	109
<u>5.7 ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DER PRIMER UND SONDEN, DIE FÜR DEN NACHWEIS VON BACILLUS ANTHRACIS VERWENDET WERDEN</u>	111
<u>5.8 SUCHE NACH PRIMERN, DIE SPEZIFISCH SIND FÜR DEN NACHWEIS DES CHROMOSOM UND DES PLASMIDS pXO2 VON BACILLUS ANTHRACIS AUS BODENPROBEN</u>	113
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u>	115
<u>7 ANHANG</u>	135

Verzeichnis der Abbildungen:

Abbildung 1: Schema des PCR Dig Detection Kit	33
Abbildung 2: Schema über den Spacerarm der Mikrotestplatte, an dem die kovalente Bindung ausgebildet wird	35
Abbildung 3: Schema über die Signalverstärkung mit dem AmpliQ	36
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuches zur Wirksamkeit des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase zur Vermeidung einer carry- over Kontamination	50
Abbildung 5: Gelelektrophorese der DNA, die mit dem EASY DNA™ Kit präpariert wird	68
Abbildung 6: Gelelektrophorese der DNA, die mit dem Puregene DNA Isolation Kit präpariert wird	68
Abbildung 7: Kurve der Absorptionswerte der mit dem Easy DNA™ Kit präparierten DNA- Lösung des Stammes A6	69
Abbildung 8: Kurve der Absorptionswerte der mit dem Puregene DNA Isolation Kit präparierten DNA- Lösung des Stammes A6	69
Abbildung 9: Nachweisgrenze der nested PCR für die mit dem Easy DNA Kit präparierte DNA	70
Abbildung 10: Nachweisgrenze der nested PCR für die mit dem Puregene DNA Isolation Kit präparierte DNA	70
Abbildung 11: Vergleich der DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung mit dem Quia quick PCR Purification Kit mit der Agarosegelelektrophorese	71
Abbildung 12: Darstellung der künstlichen carry- over Kontamination der nested PCR	72
Abbildung 13: Abbau der carry- over Kontamination durch die Uracil- DNA Glykosylase	73
Abbildung 14: Durchführung der PCR für den Nachweis der DNA des Chromosoms von <i>Bacillus anthracis</i> mit den aus der Erde isolierten Kolonien	92
Abbildung 15: PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit DNA von <i>Bacillus licheniformis</i>	93
Abbildung 16: Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts B mit BamH I und Xba I	94
Abbildung 17: Spaltung des Produktes der nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts C mit Dra I und Hae III	94
Abbildung 18: Vergleich der Sequenz von <i>Bacillus anthracis</i> mit dem sequenzierten Produkt der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern.	96
Abbildung 19: Vergleich der Sequenz von <i>Bacillus anthracis</i> mit dem sequenzierten Produkt der nested PCR aus Erdproben für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2	97
Abbildung 20: Kontrolle der Spezifität der nested PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den SJÖSTEDT et al. (1997) und von RAMISSE et al. (1996) beschriebenen Primern.	99
Abbildung 21: Kontrolle der Spezifität der PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von MAKINO et al. (1993) beschriebenen Primern.	100
Abbildung 22: Kontrolle der Spezifität der seminested PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 mit den von REIF et al. (1994) beschriebenen	

Primern.	100
Abbildung 23: Durchführung einer PCR mit den Primern für den chromosomalen Nachweis aus der Sequenz des S- Layer Proteins	101
Abbildung 24: PCR mit den Primern SAP3V und SAP3R aus Erdproben, die für den Nachweis der DNA der Plasmide pXO1 und pXO2 negativ sind	102
Abbildung 25: Nested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap B des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap10 aus einer Erdprobe, in der <i>Bacillus anthracis</i> nicht enthalten ist	103
Abbildung 26: Semಿನested PCR für den Nachweis des Genabschnitts cap C des Plasmids pXO2 mit dem inneren Primer Cap20rev aus einer Erdprobe, in der <i>Bacillus anthracis</i> nicht enthalten ist	104

Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Stämme	37
Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer	44
Tabelle 3: Liste der Primer und Sonden, die für den PCR ELISA verwendet werden	50
Tabelle 4: Konzentrationsbestimmung von DNA- Lösungen vor und nach der Reinigung mit dem Quia quick PCR Spin Purification Kit	71
Tabelle 5: Nachweis von carry- over Kontaminationen, die durch den Einsatz der Uracil- DNA Glykosylase verhindert werden können, mit dem PCR ELISA	73
Tabelle 6: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1	74
Tabelle 7: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2	74
Tabelle 8: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis der DNA des Chromosoms	75
Tabelle 9: Vergleich zwischen den Werten nach 15 bzw. 30 Min. Inkubation mit dem Anti Dig POD- Konjugat und dem ABTS Substrat	75
Tabelle 10: Vergleich zwischen den Werten des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 nach 3 h und nach 1,5 h (bzw. 1h) Hybridisierungsdauer	76
Tabelle 11: Werte des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 nach 1,5 h Hybridisierungsdauer	77
Tabelle 12: Vergleich zwischen den Werten des PCR ELISA für den Nachweis der DNA des Chromosoms nach 3 h und nach 1h Hybridisierungsdauer	77
Tabelle 13: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR Dig Detection Kit aus einer PCR im Volumen von 50 µl	78
Tabelle 14: Vergleich zwischen der nested PCR und dem PCR ELISA anhand von Erdproben, die auf das Vorhandensein von <i>Bacillus anthracis</i> überprüft werden	78
Tabelle 15: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD	79
Tabelle 16: Bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerte Substratlösungen werden direkt auf die Mikrottestplatte aufgetragen	80
Tabelle 17: PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat mit unterschiedlich gelagerten Substratlösungen	81
Tabelle 18: Auswertung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nach	

30 Minuten und nach 18 Stunden Inkubation mit der Substratlösung	81
Tabelle 19: Extinktionswerte des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit der Substratlösung	82
Tabelle 20: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1	82
Tabelle 21: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2	83
Tabelle 22: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis der DNA des Chromosoms	83
Tabelle 23: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 2 für die Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat	84
Tabelle 24: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat	84
Tabelle 25: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1	85
Tabelle 26: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2	85
Tabelle 27: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA mit kovalent an die Mikrottestplatten gebundenen Sonden für den Nachweis der DNA des Chromosoms	86
Tabelle 28: Vergleich der Sensitivität des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden	86
Tabelle 29: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 2 für die Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden	87
Tabelle 30: Vergleich zwischen der Vorschrift 1 und der Vorschrift 3 für die Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden	88
Tabelle 31: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 (Meßfilter: 492 nm, Referenzfilter: 650 nm)	88
Tabelle 32: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 (Meßfilter: 492 nm, ohne Referenzfilter)	89
Tabelle 33: Bestimmung der Nachweisgrenze des PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ verstärkt wird, für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 und des Chromosoms (Meßfilter: 492 nm, Referenzfilter: 650 nm)	89
Tabelle 34: PCR ELISA aus PCR Ansätzen, die mit 2,5 mM MgCl ₂ - Endkonzentration durchgeführt werden	90
Tabelle 35: Nachweis der DNA des Plasmids pXO1 aus 100 g Erde, die mit ca. 4 Sporen von <i>Bacillus anthracis</i> beimpft wird, mit dem PCR ELISA	90
Tabelle 36: Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 aus 100 g Erde, die mit ca. 4 Sporen von <i>Bacillus anthracis</i> beimpft wird, mit dem PCR ELISA	91
Tabelle 37 : Durchführung des PCR Dig Detection Kits für den Nachweis der DNA des Chromosoms mit den aus den Erdproben isolierten Kolonien	92

Verzeichnis der Abkürzungen:

Pkt.	Punkt
Abb.	Abbildung
ABTS	2, 2'-azinobis- 3- ethylbenzothiazolin 6- sulfonic acid
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
b	Basen
BGA	Bundesgesundheitsamt
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
cap	capsule, Kapsel
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms
cfu	colony forming unit
CSPD	Disodium 3-4-methoxyspiro 1,2-dioxetane 3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan 3-4yl phenyl phosphate
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAF	DNA Amplification Fingerprint
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Dea	Diethanolamin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DNAse	Desoxyribonuklease
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.	Escherichia

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	edema factor, Ödemfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fab	antigen binding fragment
kb	Kilobase
LF	letal factor, Letalfaktor
M	Molar
Min.	Minute
MTP	Mikrotestplatte
MTPS	Mikrotestplattenschwenker
NAD	Nikotinamid
NADPH	Nicotinamidadenindiphosphat?
NC Filter	Nitrocellulosefilter
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PA	protektive antigen, Schutzantigen
PBS	phosphate buffered saline
PCR Dig Lab Mix	Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labelling Mix
PCR	Polymerase Chain Reaction
POD	Peroxidase
RNA	ribonucleic acid
rRNA/DNA	ribosomal ribonucleic acid/ desoxyribonucleic acid
SAP	surface array protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	single stranded
SSC	Standard-Saline-Citrate-Puffer
ssp.	Subspezies
T _a	Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
TE	Tris EDTA Puffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)- amminomethan
TSA	Tryptic Soya Agar
TSB	tryptic soya broth

U	Units
UV	Ultra Violet

Die Vereinfachung des Nachweises des Kapsel- und Toxinplasmids von *Bacillus anthracis* aus Bodenprobenusammenfassung (Zusammenfassung)

Der Nachweis von Milzbrandsporen aus der Umwelt war bisher nur mit einer konventionellen nested PCR möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein PCR- ELISA entwickelt, der in verschiedenen Variationen als gebrauchsfertiger Kit gestaltet werden kann. Die PCR basiert auf aus der Literatur bekannten Primer- Paaren, die an Sequenzmotive der Plasmide pXO1 und pXO2 sowie an die chromosomale DNA binden. Für den ELISA werden zwei grundlegende Methoden erarbeitet, wovon die eine auf dem kommerziell erhältlichen PCR Dig Detection Kit der Fa. Boehringer basiert, die andere eine Beschichtung der Mikrottestplatten direkt mit den Fängersonden, über die Ausbildung von Phosphoamidid-Bindungen, verwendet. Die Denaturierung der DNA erfolgt chemisch mittels NaOH, die Hybridisierung an die Sonden und die Immobilisierung an die Platten geschieht in einem Arbeitsschritt. Bei beiden Methoden wird das Amplicon (PCR Produkt) mittels Digoxigenin-11- dUTP während der PCR markiert. Die Detektion der Markierung erfolgt in einem ELISA mittels AP- oder POD- markierter Antikörper gegen Digoxigenin. Routinemäßig wird die Anwendung eines colorimetrischen Nachweises empfohlen. Um den Anwendungsbereich des Tests zu erweitern werden jedoch auch Lumineszenz- und Fluoreszenzsubstrate getestet sowie ein Enhancement- System zur Signalverstärkung. Mit der Basis- Methode ist es möglich, vier Milzbrandsporen aus 100 g Erde nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Untersuchung von mehr als 500 Umweltproben entweder mit der konventionellen nested PCR oder dem PCR ELISA zeigen, daß falsch positive Reaktionen, insbesondere bei mikrobiologisch hochaktiven Böden, erwartet werden müssen. Es kann nachgewiesen werden, daß die von PATRA et al. (1996) beschriebenen Primer für das Chromosom von *Bacillus anthracis* auch mit Stämmen von *Bacillus cereus* reagieren. Verschiedene publizierte Primer für das Plasmid pXO2 führen zu falsch- positiven Ergebnissen in einzelnen Erdproben. Die DNA- Sequenzierung der „falsch- positiven“ PCR-Produkte zeigen ausreichend viele Unterschiede zur Sequenz von *Bacillus anthracis*, um die Existenz von zumindest einem weiteren Organismus mit hoher Ähnlichkeit zu den Sequenzen des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* vorherzusagen.

Improvement of the method for the detection of the plasmids pXO1 and pXO2 of *Bacillus anthracis* from soil samples (summary)

In this study several ways of designing a PCR ELISA for the sensitive detection of *Bacillus anthracis* are elaborated and compared to each other. The PCR itself is based on pairs of primers which are described by several authors in the literature targeting sequences of the pXO1 and pXO2 plasmids as well as genomic DNA. Two basic procedures are worked out, from which one is based on a commercially available kit (PCR Dig Detection Kit, Boehringer) and the other on the technique described by RASMUSSEN et al. (1991) which is based on forming of a covalent phosphoamide- binding between a Covlink® plate coated with free amino groups and the 5' phosphate group of the chemically labeled DNA of the so called catching probe. Denaturation of DNA is done chemically by NaOH before filling the mixture into the wells of the plate, where hybridization and immobilisation are carried out in one working step. In both techniques the target DNA is labeled with digoxigenine- 11- dUTP during the PCR- step. The detection of labeled DNA fixed by hybridization to the plate bound so called catching probe is done by ELISA based on alkaline phosphatase or peroxidase labeled antibodies to digoxigenine. Generally it is recommended to use colorimetric measurement. In order to expand the usefulness of the test, luminescent and fluorescent substrates are investigated too as well as several enhancement systems for the detection

signal. With the basic method four spores of *Bacillus anthracis* can be detected in 100 g of soil.

Results from the investigation of more than 500 environmental samples with either the conventional nested PCR or the PCR ELISA showed that false-positive reactions may occur especially with samples from the microbiologically active layers of the soil. The primers described by PATRA et al. (1996) have been shown to detect some strains of *Bacillus cereus*, too. Sets of primers described for pXO2 plasmid give false positive results in some soils. DNA sequencing of the false positive PCR products showed sufficient differences to predict the existence of at least one different strain with high similarity to *Bacillus anthracis* within the capsule encoding genes.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. R. Böhm danke ich für die Themenstellung, die gewährte Unterstützung und die vortrefflichen Arbeitsbedingungen in seinem Institut.

Herrn Universitätprofessor Dr. W. Müller möchte ich ausdrücklich für die freundliche Annahme der Arbeit und deren Vertretung am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin danken.

Dr. W. Beyer danke ich für die fachkundige wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit.

Ohne Dr. W. Martens hätte ich nicht die Gelegenheit bekommen, eine Untersuchung anzufertigen, ich möchte auch ihm an dieser Stelle danken.

Nicht zuletzt danke ich dem medizinisch technischen Personal, Frau Sabine Hoche und Frau Elisabeth Blaschke für die fachkundige, technische Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter zu Hilfenahme der im Literaturverzeichnis angegebenen Publikationen angefertigt zu haben. Die Arbeit wurde in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht.

Neukirchen- Vluyn, den 7. 3 2000

Silke Pocivalsek

Lebenslauf

Silke Pocivalsek

Geitlingstr. 30
47506 Neukirchen - Vluyn
(02845/4476)



Geburtsdatum	:	18.01.1969
Geburtsort	:	Neukirchen - Vluyn
Staatsangehörigkeit	:	deutsch
Familienstand	:	ledig
Ausbildung	:	<u>1975 - 1979</u> Ernst - Moritz - Arndt - Grundschule Neukirchen - Vluyn <u>1979 - 1988</u> Julius - Stursberg - Gymnasium Neukirchen - Vluyn <u>1988 -1994</u> Freie Universität Berlin Berlin
<u>Abschluß</u>	:	Approbation als Tierarzt im September '94
Praktische Tätigkeit	:	1.12.94- 14.10.95 Gemischtpraxis bei Herrn Bieg in Losheim am See im Saarland 15.10 95- 30.6.98 klinischer Teil der Doktorarbeit an der Universität Hohenheim am Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik in Stuttgart 1.1.99- 31.12.99 Assistenz in der Kleintierpraxis des Herrn Dr. D. Birk in Harpstedt 1.1.2000- Assistenz in der Kleintierpraxis des Herrn Dr. R. Busert in Dinslaken

Neukirchen- Vluyn, den 7.3.2000

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Prodekan:	Univ.- Prof. Dr. G. Hildebrandt
Erster Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. W. Müller
Zweiter Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. R. Böhm
Tag der Promotion:	17.7.2000