

## 1 Einleitung

*Bacillus anthracis* ist der Erreger des Milzbrandes. Diese Erkrankung tritt bei Mensch und Tier mit hoher Morbidität auf und führt je nach Wirt, Infektionsart und Virulenz des Stammes zu Lokal- oder Allgemeininfektionen mit Krankheitsbildern unterschiedlicher Schwere. Die Allgemeininfektion verläuft letal. In den Industrieländern ist die Erkrankung durch geeignete Vorbeugemaßnahmen selten geworden. Die Milzbrandinfektion hat jedoch weltweit immer noch eine große Bedeutung, z. B. in Asien, Afrika sowie in Süd- und Mittelamerika. In Süd- und Osteuropa wird sie noch gelegentlich festgestellt. Im übrigen Europa sowie in Nordamerika kann sie gelegentlich nach Import kontaminierter Produkte sporadisch vorkommen. In der Bundesrepublik Deutschland ist der Erreger des Milzbrandes an ehemaligen Industriestandorten, an denen bestimmte Produkte tierischer Herkunft, z. B. Häute be- und verarbeitet wurden, als Altlast ein Problem. Der Erreger bleibt in seiner versporteten Form mindestens 40 Jahre und wahrscheinlich länger im Boden überlebensfähig (MANCHEE, 1983). DE VOS (1990) berichtet von Sporen, die aus Knochen isoliert wurden, deren Alter auf 200 Jahre geschätzt wurde.

Durch die Erkenntnisse, die aus der Arbeit entsprechender internationaler Kommissionen nach dem Golfkrieg resultieren, spielt *Bacillus anthracis* nach wie vor im Bereiche des medizinischen B- Schutzes eine wichtige Rolle. Der Entwicklung eines Nachweises zur Detektion von Milzbrandsporen aus Bodenproben kommt also eine besondere Bedeutung zu. Für den sicheren Nachweis empfahl BÖHM (1985) die Verwendung von sich im Prinzip unterscheidenden Diagnosemethoden.

Der Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen wurde in den letzten Jahren eine wichtige Alternative und Ergänzung zu den herkömmlichen mikrobiologischen Nachweisverfahren. Untersucht werden hierbei nicht die phänotypischen Merkmale eines Mikroorganismus, wie es bei der kulturellen, mikroskopischen, biochemischen oder serologischen Diagnostik der Fall ist, sondern das Vorhandensein bestimmter Genomabschnitte wird nachgewiesen. Je nach Wahl der Sonden oder Primer, sowie der Reaktionsbedingungen, können gattungs-, art-, stamm-, oder individualspezifische DNA- Abschnitte nachgewiesen und sowohl zur Diagnostik wie auch zur Bearbeitung epidemiologischer Fragestellungen und zur Erkennung herangezogen werden. Zwar können mit der PCR geringste Mengen der gesuchten DNA nachgewiesen werden, doch birgt die große Sensitivität auch die Gefahr für falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen.

Zum Nachweis von *Bacillus anthracis* wurde bislang die PCR verschiedener Gene, die auf den Plasmiden lokalisiert sind, beschrieben (TURNBULL et al., 1992; CARL et al., 1992; MAKINO et al., 1994; BEYER et al., 1995; PATRA et al., 1995; GLÖCKNER, 1996). PATRA et al. (1996) beschreiben eine chromosomale Sequenz von *Bacillus anthracis* und deren mögliche Anwendung in der Diagnostik von *Bacillus anthracis*. ETIENNE-TOUMELIN et al. (1995) beschrieben die genetische Sequenz des S- Layer Proteins von *Bacillus anthracis*, die ebenfalls auf dem Chromosom des Erregers lokalisiert ist.

Auf der Grundlage des Nachweises bestimmter genetischer Sequenzen der auf den Plasmiden liegenden Virulenzfaktoren entwickelten BEYER et al. (1995) und SJÖSTEDT et al. (1997) mit Hilfe der PCR ein Nachweisverfahren für *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

Die Anfälligkeit der PCR, vor allem der nested PCR, gegenüber Kontaminationen und die zeitliche Ausdehnung der Arbeitsschritte machen das Nachweisverfahren ungeeignet für die Routinediagnostik. Die ELISA- Technik ist eine in der Routinediagnostik übliche Nachweismethode, die als PCR ELISA eine einfachere Alternative zur nested PCR darstellt.

In der vorliegenden Arbeit soll das Verfahren der Anzucht von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, die DNA Präparation und der Nachweis des Erregers mittels PCR ELISA weitestgehend verkürzt und vereinfacht werden, so daß er von einem Routinelabor geleistet

werden kann. Dabei werden alternativ verschiedene kommerziell erhältliche DNA Präparationskits und mehrere PCR ELISA- Techniken untersucht. Der Nachweis betrifft sowohl Sequenzen der beiden Plasmide als auch des Chromosoms. Weiterhin sollen die hierfür verwendeten Primer und Sonden auf ihre Spezifität für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben überprüft werden, um endgültig eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Diagnostik von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mittels PCR zu ermöglichen.

Die Arbeit dient dem Ziele, die DNA- Präparation aus Erdproben soweit wie möglich zu vereinfachen und den Nachweis der PCR Produkte auf der Mikrotiterplatte zu führen, um ein für ein Routinelabor durchführbares Verfahren anzubieten. Ferner soll der Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben auf Basis der chromosomalen DNA geführt werden. Zusätzlich wird die Spezifität der PCR für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben überprüft.