

## 2 Literatur

### 2.1 *Bacillus anthracis*

*Bacillus anthracis* ist ein Gram positives 3- 5 µm langes und 0,8- 1,2 µm breites Stäbchen und wird der Familie der Bacillaceae und dem Genus *Bacillus* zugeordnet (CLAUS und BERKELEY, 1986). *Bacillus anthracis* ist eng verwandt mit *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus megaterium* (BÖHM, 1985). Vegetative Zellen virulenter *Bacillus anthracis*- Stämme bilden im Tierkörper und auf bikarbonathaltigen Nährmedien unter CO<sub>2</sub> haltiger Atmosphäre eine Kapsel. Die Fähigkeit zur Kapselbildung und die Toxinproduktion stellen charakteristische Virulenzfaktoren dar. Bestandteile des Milzbrandtoxins sind der Ödemfaktor, der Letalfaktor und das Schutzantigen, welches beide Faktoren zur Entfaltung ihrer pathophysiologischen Wirkung benötigen (VODKIN und LEPLA, 1983). Die Gene, die für die Hauptbestandteile des Toxins codieren, liegen auf dem Plasmid pXO1 (MIKESELL et al., 1993; LEPLA et al., 1996; ROBERTSON et al., 1990). Die Information zur Kapselbildung befindet sich auf dem Plasmid pXO2 (UCHIDA et al., 1985). Die Avirulenz verschiedener *Bacillus anthracis*- Stämme beruht daher auf dem Fehlen eines der beiden Plasmide (MIKESELL et al., 1983).

Unter suboptimalen Lebensbedingungen und ausreichendem Angebot von Sauerstoff versporen die Milzbrandbazillen und können in dieser Dauerform Jahrzehnte überdauern, ohne ihre Infektionsfähigkeit zu verlieren. Die ellipsoiden Sporen liegen zentral in den Sporangien und treiben diese nicht auf.

*Bacillus anthracis* wächst im Gegensatz zu *Bacillus cereus* auf Schafblutagar ohne sichtbaren Hämolysehof. Die Kolonien sind unter aeroben Bedingungen trocken, grauweiß und besitzen eine körnige Oberfläche. Es können sich sichelförmige Ausläufer bilden, wodurch das charakteristische Bild der „Medusenhauptkolonie“ entsteht.

Die Milzbranderkrankung ist eine anzeigepflichtige Zoonose, wobei die Ansteckung des Menschen fast ausschließlich über infizierte Tiere oder infizierte Produkte erfolgt. Bedeutung hat dabei besonders die Erkrankung von Haus- und Nutztieren, wobei am häufigsten Rind, Schaf und Ziege erkranken. Aber auch von Pferd, Hund, Katze und Schwein sind Infektionen bekannt.

In West- Nord- und Mitteleuropa kommt Milzbrand aufgrund seuchenprophylaktischer Bekämpfungsmaßnahmen nur noch sporadisch nach Import kontaminierter Produkte vor (BÖHM, 1985). Die am stärksten betroffenen europäischen Länder sind die Türkei (DOGANAY, 1995), Griechenland, Albanien, Süditalien und Zentral Spanien (HUGH-JONES, 1995). In Frankreich treten vor allem in den Pyrenäen und in den Alpen sporadisch Fälle von Anthrax auf (PATRA et al., 1998). In den USA traten von 1984 bis 1993 nur drei Fälle von Hautmilzbrand beim Menschen auf (LAFORCE, 1994). In Kanada erlagen 1993 172 Bisons dem Erreger (DRAGON und RENNIE, 1995). In Guatemala und Chile ist die Milzbranderkrankung endemisch (HUGH-JONES, 1995). Die Erkrankung tritt in vielen Ländern Afrikas, Asiens, Süd- und Mittelamerikas noch häufig auf (HUGH-JONES, 1998; JOSHI, 1998). Von 1990 bis 1993 wurden in ganz China 8122 Fälle gemeldet, von denen 324 tödlich endeten (XUDONG et al., 1995). Von 1956- 1997 wurden in China 112148 Fälle registriert, davon 4118 mit tödlichem Ausgang (XUDONG, 1998). 1992 wurden in Japan zwei Fälle von Hautmilzbrand bekannt (NATORI, 1995). In Zambia werden seit 1970 ein bis drei Ausbrüche pro Jahr gemeldet. Im Zeitraum von 1981 bis 1990 starben in Tansania 97585 Rinder an der Krankheit (DE BALOGH et al., 1994). Im Sommer des Jahres 1997 trat die Erkrankung endemisch in Australien auf (TURNER et al., 1998).

Bei den hochempfindlichen Pflanzenfressern verläuft die Krankheit septikämisch perakut mit raschem Tod nach wenigen Stunden oder akut mit hohem Fieber, Schweratmigkeit, Blutungen aus den Körperöffnungen und Tod nach 12- 36 Stunden. Beim verendeten Tier sind die dunkle Farbe des Blutes mit schlechter Gerinnungsfähigkeit und die dunkle, geschwollenen Milz charakteristisch.

Bei weniger empfänglichen Tieren kann sich auch eine lokale Milzbrandinfektion entwickeln, z. B. beim Schwein Rachenmilzbrand oder Gekrösemilzbrand. Beim Menschen kommt in 95 % der Erkrankungen der Hautmilzbrand vor, bei dem sich innerhalb einer Woche nach Infektion der typische Milzbrandkarbunkel entwickelt. Ohne Behandlung liegt die Letalität bei 20 %. Lungenmilzbrand, Darmmilzbrand und oropharyngealer Milzbrand treten selten auf und führen innerhalb weniger Tage zum Tode.

*Bacillus anthracis* ist penicillinempfindlich, so daß eine hochdosierte, antibiotische Therapie mit Penicillin G oder halbsynthetischen Penicillinen empfohlen wird. Wichtig für den Erfolg der Therapie ist eine rasche Diagnosestellung und ein Antibiogramm, da auch penicillinresistente Stämme vorkommen (KOSHIMIZU et al., 1972; CLAUS und BERKELEY, 1986)

Zwischen *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* und *Bacillus thuringiensis* besteht eine besonders hohe Verwandtschaft (KANEKO, 1978; BÖHM, 1985; WUNSCHHEL et al., 1994; BOURQUE et al., 1995). Auch die Taxonomie dieser Gruppe wird kontrovers diskutiert, da große Ähnlichkeiten zwischen der Nukleotidsequenz der 16S und 23S rRNA Gene und der dazwischenliegenden intergenen Region bestehen (ASH et al., 1992; BOURQUE et al., 1995; HENDERSON et al., 1994). Da die Sporen von *Bacillus megaterium* häufig in Bodenproben aus südlichen Regionen vorkommen (BECK, 1968), können sie mit den Sporen von *Bacillus anthracis* verwechselt werden. EZZEL et al. (1990) fordern z. B., einen Stamm von *Bacillus megaterium*, der in ihren Untersuchungen hämolysiert, das Schutzantigen produziert, eine Kapsel bildet und im Phagentest positiv reagiert, der Spezies *Bacillus anthracis* zuzuordnen.

Die Sporen von *Bacillus subtilis* sind ebenso wie bei *Bacillus cereus* ubiquitär und finden sich daher neben anderen aeroben Sporenbildnern zu einem großen Anteil im Boden (BECK, 1968). *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* exprimieren kapselähnliche Substanzen, die immunologisch kreuzreaktiv sind.

## **2.2 Diagnostik von *Bacillus anthracis***

Die Diagnose von Milzbrand erfolgt zum einen über das klinische Bild, da *Bacillus anthracis* zu pathognomischen Veränderungen führt. Zum anderen wird der Erreger im Untersuchungsmaterial nachgewiesen. Diesem zweiten Bereich kommt in unseren Breiten größere Bedeutung zu, da infektiöses Material aufgespürt werden soll, ehe es zu Infektionen von Mensch und Tier kommt.

### **2.2.1 Konventionelle Verfahren**

#### **mikroskopische Untersuchung**

Für den mikroskopischen Nachweis von *Bacillus anthracis* stehen unterschiedliche Färbemethoden zur Verfügung (M'FADYEAN, 1903; DUGUID, 1951; KALICH, 1957; WIRTZ, 1908; CONKLIN, 1934; PAIK; HALLMANN und BURKHARD, 1974; SUGGS, 1974 und DAVID et al., 1993). Der mikroskopische Nachweis ist für die Detektion der Sporen von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ungeeignet, da 5- 90 % der Mikroorganismen im Erdboden Sporenbildner sind.

## Perlschnurtest

Der Perlschnurtest (JENSEN und KLEEMEYER, 1953; SEIDEL, 1963; SHLYAKHOV und JOUBERT, 1970; BAILIE und STOWE, 1977; FEELEY und PATTON, 1980) weist *Bacillus anthracis* durch sein charakteristisches Wachstum in penicillinhaltigen Nährböden nach. *Bacillus anthracis* nimmt in penicillinhaltigen Nährböden eine kugelig deformierte Form an und lagert sich entweder als Knäuel oder in Form einer Perlschnurkette zusammen. Penicillinresistente Stämme von *Bacillus anthracis* können mit dem Perschnurtest nicht nachgewiesen werden (KOSHIMIZU et al., 1972).

## Kultureller Nachweis

Eine Diagnostik von *Bacillus anthracis* allein aufgrund seiner kulturellen Eigenschaften ist nicht möglich, jedoch kann das Kulturverhalten einen diagnostischen Hinweis auf *Bacillus anthracis* darstellen. Bei der Kultivierung auf Blutagar bildet *Bacillus anthracis* in der Regel weißliche Kolonien mit einer stumpfen Oberflächen aus. Virulente Stämme bilden meist zusätzlich charakteristische Ausläufer aus (Medusenhaupt). *Bacillus anthracis* bildet keine Hämolysezone aus.

Die Unbeweglichkeit des Keimes kann mittels Stichkultur oder Transmigrationskultur in halbfestem Agar nachgewiesen werden. Eine Reinkultur von *Bacillus anthracis* zeigt in einer Bouillon ein flockiges Wachstum ohne Trübung.

Der Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ist durch den hohen Anteil anderer Sporenbildner erschwert (TITBALL et al., 1991 und TURNBALL et al., 1992). Von den bisher entwickelten Selektivnährmedien (KNISELY, 1966; SHAPOVALOVA, 1966; TOMOV und TODKOV, 1966 und TURNBULL et al., 1986) liefert das PLET Nährmedium (KNISELY, 1966) nach Aussagen von MANCHEE et al. (1981) und TURNBULL et al. (1986) noch die besten Ergebnisse. MANCHEE et al. (1981) weisen 3 Sporen von *Bacillus anthracis* aus einem Gramm Erde nach. Tatsächlich waren bisher jedoch alle Versuche, ein selektives Anreicherungs-nährmedium für *Bacillus anthracis* zu entwickeln erfolglos (TURNBULL et al., 1986; 1993).

## Biochemische Charakterisierung

BAILLIE et al. (1994) testen die biochemische Charakterisierung mit dem Biolog System<sup>1</sup> zur Diagnostik von *Bacillus anthracis*. Sie stellen dabei fest, daß es aufgrund falsch positiver oder keiner Ergebnisse vor allem mit Stämmen von *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus cereus* nur geeignet ist für eine schnelle (innerhalb 24 h) oberflächliche Einschätzung und daß die Diagnose durch weitere Tests bestätigt werden muß.

Eine Differenzierung zwischen *Bacillus anthracis* und den nahe verwandtem *Bacillus cereus* ist mit dem kommerziell erhältlichen ApiCH50<sup>2</sup> Test möglich. Die Daten werden dabei mit modernen statistischen Methoden unter Einbeziehung morphologischer Kriterien ausgewertet.

## Präzipitation nach ASCOLI (1911)

Milzbrandserum präzipitiert beim Überschichten mit Milzbranantigenen in Form eines weißlichen trüben Niederschlags (ASCOLI, 1911; BRÜCKLER und BLOBEL, 1979). Zur Diagnostik von *Bacillus anthracis* in Blut, Organen, Häuten, Fellen, Wolle und getrockneten oder gepökelten Fleischwaren ist die Präzipitation nach ASCOLI (1911) geeignet. Ungeeignet ist sie aber beim Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Knochenmehl, Futtermitteln und

<sup>1</sup> Biolog, Inc., Hayward, CA

<sup>2</sup> Api bio Mérieux GmbH, D- Nürtingen

Bodenproben (TURNBULL et al., 1993), da dieses Untersuchungsmaterial sehr viele andere Bazillen enthält, die zu unspezifischen Reaktionen führen können (TURNBULL et al., 1993). JENSEN und KLEEMEYER (1953) beurteilen die Ascolireaktion als wenig zuverlässig.

### **Phagentest**

Mit dem Phagentest lassen sich nur unbekapselte Milzbrandbazillen nachweisen (KIELWEIN, 1957; DOWDLE und HANSEN, 1961). Nach sechs bis acht Stunden ergeben sich immer eindeutige Ergebnisse (BROWN und CHERRY, 1955; KIELWEIN, 1957).

Die hierfür verwendeten  $\gamma$ - Phagen werden von KIELWEIN (1957) mit insgesamt 65 Stämmen von *Bacillus cereus* getestet, dabei werden nur zwei Stämme von *Bacillus cereus* durch den Phagen lysiert.

### **Tierversuch**

Der Tierversuch gilt als die empfindlichste Methode für den Nachweis von *Bacillus anthracis* (TITBALL et al., 1991 und TURNBULL et al., 1993). Er stellt gleichermaßen einen Virulenztest sowie ein Anreicherungs- und Nachweisverfahren dar (BÖHM, 1988). Ein Vorteil stellen die einfache Handhabung, die Sensitivität und das rasche Ergebnis des Bioassays dar. Ein Tierversuch wird aus ethischen Gründen als Standardmethode für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben nicht durchgeführt.

### **Differenzierung mit Hilfe von experimentellen Verfahren**

COLE et al. (1984) setzen sechs spezifische, galaktosebindene Lektine ein, mit deren Hilfe sich ein typisches Agglutinationsprofil ergibt. Mit dieser Methode lassen sich sowohl vegetative Milzbrandbazillen, als auch Sporen differentialdiagnostisch von *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus mycoides* abgrenzen. GRAHAM et al. (1984) entwickeln einen Enzyme- linked Lektinsorbent Assay (ELLA), bei dem zwei mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Lektine eingesetzt werden. Der Test ist sehr sensitiv und spezifisch und innerhalb von zwei Stunden durchführbar.

BÖHM (1988; 1981) beschreibt den Nachweis von *Bacillus anthracis* mit der Pyrolyse-Massenspektrometrie. Diese Methode ist mit aufwendiger Gerätetechnik verbunden und befindet sich noch im Experimentalstadium.

#### **2.2.2 Immunologische und serologische Verfahren**

Aufgrund der engen Verwandtschaft der Sporenbildner untereinander treten bei der Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern für den Nachweis von *Bacillus anthracis* häufig Kreuzreaktionen auf. CHERRY und FREEMAN (1959) setzen einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper gegen unbekapselte Milzbrandbazillen ein, der deutliche Kreuzreaktionen mit *Bacillus cereus* und *Bacillus megaterium* aufweist.

## Fluoreszenzserologische Methoden

Für den fluoreszenzserologischen Nachweis eignen sich sowohl die Sporen, als auch die bekapselte und die unbekapselte vegetative Form von *Bacillus anthracis*. Der Nachweis ist innerhalb von ca. zwei Stunden durchführbar und die Ergebnisse sind direkt verfügbar (BÖHM, 1988).

BÖHM und STRAUCH (1973) weisen Mikrokolonien von unbekapselten Milzbrandbazillen im Alter von vier bis fünf Stunden auf fluoreszenzfreien Membranfiltern fluoreszenzserologisch nach. Alle 20 untersuchten Stämme von *Bacillus anthracis* waren im Vergleich zu den 21 Stämmen anderer Sporenbildner deutlich positiv.

DOWDLE und HANSEN (1961) verwenden einen gegen den  $\gamma$ - Phagen gerichteten mit Fluoreszin markierten Antikörper. Bekapselte Milzbrandbazillen lassen sich mit dieser Methode nicht nachweisen und es treten Kreuzreaktionen mit *Bacillus cereus* und *Bacillus mycoides* auf.

EZZEL (1990) weist die unbekapselte, vegetative Form von *Bacillus anthracis* mit zwei gegen die N- acetyl- D- Glucosamine der Zellwand gerichteten Antikörpern nach. Dabei werden auch plasmidfreie Stämme von *Bacillus anthracis* nachgewiesen. Dieser Nachweis ist schnell und spezifisch.

## Immunologische Verfahren

NIEDERWÖHRMEIER (1987) diagnostiziert die vegetative Form von *Bacillus anthracis* mit einem polyklonalen Antiserum in einem Festphasen- Enzym- Immunoverfahren. Dabei werden Polystyrolkugeln, die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet sind, verwendet. Ein 100 % spezifischer Nachweis gelingt zwar nicht, doch das Verfahren ist grundsätzlich anwendbar.

KLEINE-ALBERS (1988) erstellt einen Enzym- Immunoassay zum Nachweis des Schutzantigens von *Bacillus anthracis*. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers ist der Nachweis von 30- 60 ng Schutzantigen pro ml Flüssigkultur innerhalb von etwa einer Stunde möglich. Mit dieser Methode werden toxinbildende Milzbrandbazillen erfaßt und es treten keine Kreuzreaktionen mit anderen Sporenbildnern auf.

MAYR (1997) isoliert *Bacillus anthracis* aus Rein- und aus Mischkulturen mittels immunomagnetischer Separation. Dabei werden paramagnetische Partikel mit Antikörpern beschichtet. Die von MAYR (1997) verwendeten Antikörper stammen aus dem Anti- A1 Hybridom G10E2. Von zwölf mit dem Festphasen Enzym- immuno- assay (EIA) getesteten Stämmen treten Kreuzreaktionen mit dem Anti- A1 Hybridom G10E2 nur bei *Bacillus cereus* B189 auf (WITZMANN, 1989). Die Wiederfindungsrate von *Bacillus anthracis* mit der immunomagnetischen Separation aus der Reinkultur ist aber nur gering und die Separation aus der Mischkultur ist nicht spezifisch (MAYR, 1997).

BRUNO und YU (1996) benutzen ein polyklonales Antiserum, das gegen die Milzbrandstämme Ames, Vollum B1 und Sterne gerichtet ist für den Nachweis dieser Stämme aus einem Puffer und aus beimpften Erdproben. Die Antikörper sind mit Biotin beschichtet und binden an einen mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikel. Die Antikörper werden über ein Reporter- Antiserum, dessen Antikörper mit einem Chemilumineszenzfarbstoff beschichtet sind, nachgewiesen. Aus dem Puffer können zwischen 102 bis 105 Sporen nachgewiesen werden, die Sensitivität für den Nachweis aus Erdproben ist allerdings um den Faktor 1000 geringer.

SHLYAKOV und RUBINSTEIN (1996) weisen über den Anthraxin Hauttest sowohl eine akute als auch eine frühere Erkrankung eindeutig nach. Dabei wird die zellvermittelte

Immunität mit einem kommerziell erhältlichen Proteinpolysaccharid Nukleinsäure- Komplex nachgewiesen.

### 2.2.3 Molekulare Verfahren

Grundsätzlich kommen die Hybridisierungstechnik und die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Anwendung. Um gezielt spezifische Sonden bzw. Primer für den Nachweis von *Bacillus anthracis* zu erhalten, ist es notwendig, die Nukleotidsequenz der entsprechenden Gene zu kennen. ESCUYER et al. (1988) beschreiben die Sequenz des Ödemfaktors, WELKOS et al. (1988) beschreiben die Sequenz des Schutzantigens, BRAGG und ROBERTSON (1989) beschreiben die Sequenz des Letalfaktors, MAKINO et al. (1989) beschreiben die Sequenz der cap Region, die für die Bildung der Kapsel wichtig ist und ETIENNE- TOUMELIN (1995) sequenzieren auf dem Chromosom liegende Strukturgene. Da es bei *Bacillus anthracis* immer wieder zu Plasmidverlusten kommt (TURNBULL et al., 1992; GLÖCKNER, 1996) und ein plasmidfreier Stamm nur schwer von *Bacillus cereus* zu unterscheiden ist, ist der Nachweis des Chromosoms sehr wichtig. GLÖCKNER (1996) beschreibt die DAF- Methode (DNA Amplification Fingerprinting) für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis*. Sie eignet sich jedoch nur als Koloniebestätigungstest und keinesfalls zum Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, weil die daraus gewonnene DNA ein Gemisch von Genomen unterschiedlicher Erreger darstellt. Einen anderen Ansatz für die Suche nach einer chromosomalen Sequenz führen PATRA et al. (1996) durch, sie suchen unabhängig von dem zugehörigen Gen nach einer spezifischen chromosomalen Sequenz. Dazu errichten sie eine Cosmidbibliothek, indem sie die DNA eines avirulenten Milzbrandstammes partiell mit einem Restriktionsenzym verdauen, die unterschiedlichen Fragmente auftrennen, und in ein Cosmid einbauen. Die Cosmid DNA wird vollständig mit Restriktionsenzymen verdaut, auf ein Filter übertragen und mit radioaktiv markierter DNA von verschiedenen Milzbrandstämmen und Stämmen von *Bacillus cereus* hybridisiert. Ein Klon ergibt hierbei ein starkes spezifisches Signal. Das spezifische DNA Fragment Ba813 ist 277 bp lang und ist nur einmal in der chromosomalen Sequenz von *Bacillus anthracis* enthalten.

PATRA et al. (1994) führen den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* mit den Primern R1 und R2, die aus der Sequenz von Ba813 stammen. Sie hybridisieren das PCR Produkt anschließend an die Fängersonde C1 und an die mit Biotin markierte Sonde D3, die beide aus der Sequenz von Ba813 stammen und weisen das PCR Produkt colorimetrisch in der Mikrottestplatte mittels PCR ELISA nach. RAMISSE et al. (1995 und 1996) beschreiben eine multiplex PCR für den Nachweis aller Virulenzfaktoren sowie der chromosomalen DNA von *Bacillus anthracis*. Sie benutzen hierfür Primer aus der Sequenz des Ödemfaktors, des Schutzantigens, des Letalfaktors, der Kapsel und das Primerpaar R1 und R2 für den Nachweis des Chromosoms.

HUTSON und DUGGLEBY (1990) stellen eine nichtradioaktiv markierte Gensonde aus dem Gen des Schutzantigens von *Bacillus anthracis* her. Mit dieser Sonde kann nach Hybridisierung mit auf Nylonmembranen übertragener DNA der spezifische Nachweis des Plasmids pXO1 geführt werden. MISTELE (1992) hybridisiert mit einer mit Biotin markierten Genomsonde von *Bacillus anthracis* in Mikrottestplatten und konnte so die aus einer Einzelkolonie innerhalb von 10- 12 Stunden gewonnene DNA nachweisen.

HUTSON et al. (1993) benutzen PCR- Produktsonden für den Nachweis des PA Gens. Zusätzlich verwenden sie Oligonukleotidsonden für den Nachweis des EF (edema factor), des LF (lethal factor), des PA (protective antigen) und des Gens für die Kapselbildung. Die Sonden werden radioaktiv oder mit Digoxigenin- dUTP markiert. Als Spezifitätskontrolle dienen eine große Anzahl von Milzbrandstämmen, einige Stämme von *Bacillus cereus* und *E.*

*coli*. Die Sonden werden mittels slot- blot, colony blot und Southern blot an die DNA dieser Stämme und an DNA, die aus verdächtigen Erdproben isoliert wird, hybridisiert. Zur Sensitivitätskontrolle werden sterilisierte Erdproben mit Sporen von *Bacillus anthracis* beimpft. HUTSON et al. (1993) weisen  $10^3$  Sporen pro g Erde mit den Oligonukleotidsonden nach und  $10^2$  Sporen pro g Erde mit den PCR Produktsonden nach. Eine Spezifitätskontrolle in Form einer Erdprobe, die von einem für das Vorkommen von *Bacillus anthracis* unbedenklichen Standort stammt, wird nicht durchgeführt.

TURNBULL et al. (1992) weisen beide Plasmide von *Bacillus anthracis* mit Hilfe der PCR nach. CARL et al. (1992) weist mit einer nested PCR zwei Sporen von *Bacillus anthracis* durch Amplifikation eines Fragmentes aus dem Gen für den Ödemfaktor auf dem Plasmid pXO1 nach. Die Spezifität der Primer wird mit zahlreichen Species, darunter auch viele Bazillen überprüft. Ein Homologievergleich aus der Datenbank (Gen Bank) ergibt keinen Hinweis auf das Bestehen von Homologien zu anderen Mikroorganismen. JOHNS et al. (1994) amplifizieren Fragmente aus dem Gen für das Kapselplasmid und dem Ödemfaktorgen und weisen weniger als zehn Sporen nach. REIF et al. (1994) amplifizieren ein 622 bp langes Fragment aus dem Genabschnitt B des Plasmids pXO2. Sie führen Spezifitätskontrollen mit Stämmen des Genus *Bacillus* und mit Stämmen anderer Genera durch. Sie weisen das PCR Produkt anschließend durch eine Hybridisierung an zwei Sonden und schließlich über die Hydrolyse von Harnstoff mit anschließend meßbarer Änderung des pH- Wertes nach. MAKINO et al. (1993) weisen *Bacillus anthracis* mit der PCR aus Blut- und Milzbrandproben von Versuchsmäusen innerhalb von 8 h nach der Inokulation des Erregers nach. Die von MAKINO et al. (1993) verwendeten Primer stammen aus der capA Region, deren Gehalt an Guanin und Cytosin, bis auf die beiden Stellen aus denen die Primer stammen, mit ca. 30 % ein weiteres Auffinden von Primern unmöglich macht. BEYER et al. (1995) weisen 4 Sporen von *Bacillus anthracis* aus 100 g Erde nach. Sie gewinnen die DNA dabei aus einer Voranreicherung und weisen die Plasmide pXO1 und pXO2 mit Hilfe der nested PCR nach. SJÖSTEDT et al. (1997) weisen *Bacillus anthracis* ohne Voranreicherungsschritt direkt aus Bodenproben nach. Größere Schwierigkeiten aufgrund von Hemmstoffen lösen sie mit Hilfe einer generate PCR, bei der zunächst eine unspezifische Vermehrung von DNA Fragmenten erfolgt. Im Anschluß an die generate PCR führen sie eine PCR mit spezifischen Primern durch.

### **2.3 Nachweis von Mikroorganismen aus klinischen Proben, sowie Umwelt- und Lebensmittelproben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion**

Für die Durchführung der PCR muß die DNA der Mikroorganismen aus den Proben gewonnen werden. Die PCR ist zwar eine sehr effektive Technik, wenn mikrobielle Kulturen untersucht werden, die Sensitivität der PCR kann aber dramatisch abnehmen, wenn die PCR direkt zur Untersuchung von Umwelt, Lebensmittel- oder klinischen Proben verwendet wird. Die komplexe Zusammensetzung solcher Proben kann die PCR hemmen. Für die Isolierung von Mikroorganismen aus klinischen Proben, aus Umwelt- und aus Lebensmittelproben gibt es generell physikalische Methoden und Methoden der Adsorption (LANTZ et al., 1994a).

#### **Filtration**

BEYER et al. (1995) inkubieren 100 g Erde in 200 ml destilliertem Wasser mit 60 g Glaskügelchen bei Raumtemperatur für ca. 15 Stunden. Anschließend werden die Erdproben durch Siebe mit 500 und 250 µm Maschengröße gefiltert. SJÖSTEDT et al. (1997) mischen die Erdproben im Verhältnis 1 : 9 mit Quarzsand und filtern sie durch Ultra free- MC Filter (Durapore) mit einer Porengröße von 0,22 µm. LANTZ et al. (1994) beschreiben den

Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus Milch nach Filtration durch einen Polysulphonfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm. Ein Nachteil der Filtration ist, daß die Hemmstoffe der PCR mit den Mikroorganismen zusammen konzentriert werden können.

### **Voranreicherung**

Durch eine Voranreicherung werden nur die lebensfähigen Zellen vermehrt, während die abgestorbenen Zellen zusammen mit den Hemmstoffen verdünnt werden, gleichzeitig steigt durch eine Voranreicherung die Sensitivität des Nachweises (LANTZ et al., 1994a). MEIXNER (1994) weist Salmonellen aus Umweltproben, wie Biokompost, Klärschlamm, Hühner-, Schweine- und Rindergülle nach. Die Probenbearbeitung der mit Salmonellen beimpften Umweltproben gestaltet sich nach konventioneller Art und umfaßt eine Voranreicherung in Peptonwasser und eine Selektivanreicherung in RAPPAPORT-VASSILIADIS- Selektivanreicherungsbouillon. JOHNSON (1985) betont die Bedeutung der Bakterienanzucht und empfiehlt, die Zellen in der späten logarithmischen oder in der frühen stationären Phase zu ernten. Die Zellen sollen noch nicht sporuliert und wegen der autolytischen Enzyme noch nicht abgestorben sein. Da Bazillen versporen und Sporen die Lysebehandlung überleben können, empfiehlt MARMUR (1961), die Bakterien vor der Sporulation zu ernten. MISTELE (1992), BEYER et al. (1995), GLÖCKNER (1996) und ROLOFF (1997) ernten die Bazillen nach einer sechsständigen Subkultur, die aus einer Übernachtkultur angelegt wird.

Wird mit pathogenen Stämmen von *Bacillus anthracis* gearbeitet, muß sichergestellt sein, daß keine keimungsfähigen Sporen in der DNA- Lösung zurückbleiben. SPÄTH (1989), MISTELE (1992), BEYER (1995) und GLÖCKNER (1996) gewährleisten das durch Abtöten der Bakterien mit 3 % Wasserstoffperoxid für eine Stunde. Nach dem Abtöten werden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und zweimal mit 20 ml 0,05 M TrisHCl (pH 7,2) gewaschen, um die Reste des Wasserstoffperoxids zu entfernen. Nach dieser Behandlung kann die DNA aus den Bazillen für die PCR oder für Hybridisierungsexperimente gewonnen werden.

### **Zentrifugation**

LANTZ et al. (1994a) beschreiben, daß Bakterien aus Milch und Urin durch Zentrifugation von den löslichen Hemmstoffen in der Probe getrennt werden. Oft ist diese Trennung nicht perfekt, da größere Partikel aus der Probe sich zusammen mit den Bakterien im Pellet absetzen. DELACOURT et al. (1995) depolymerisiert die Glykoproteine im Bronchialsekret durch Spaltung von Disulfidbrücken mit Hilfe von N- Acetylcystein. Urin, Pleural- und Cerebrospinalflüssigkeit werden genau wie das verflüssigte Bronchialsekret anschließend zentrifugiert.

### **Wäßrige Zweiphasensysteme**

Wäßrige Zweiphasensysteme werden benutzt für die Trennung von Makromolekülen, Membranen, Zellorganellen und Zellen. Sie basieren auf wäßrigen Lösungen zweier Polymere mit unterschiedlichen chemischen Strukturen. Das meist verwendete wäßrige Zweiphasensystem besteht aus Polyethylenglykol (PEG), Dextran und Wasser. Das PEG reichert sich in der oberen Phase an und das Dextran in der unteren Phase. Die Verteilung der Partikel auf die beiden Phasen hängt von deren Größe und Oberflächeneigenschaften ab. Durch die Anreicherung von Phosphationen in der unteren Phase, entsteht darüber hinaus ein elektrisches Potential. Die Hemmstoffe der PCR sammeln sich in der oberen PEG- reichen Phase, während sich die Bakterien in der unteren Dextran- reichen Phase ansammeln. LANTZ

et al. (1994b) reduzieren die Nachweisgrenze von *Listeria monocytogenes* aus Danish Blue Castello Käse durch das wäßrige Zweiphasensystem um 3 Zehnerpotenzen. Beim Nachweis von *Helicobacter pylori* aus Kotproben wird die Nachweisgrenze durch das wäßrige 2 Phasensystem um 4 Zehnerpotenzen gesenkt. Die in den Kotproben enthaltenen Gallensalze sammeln sich dabei in der oberen PEG- reichen Phase an (LANTZ et al., 1997).

### **Verdünnung**

Die Verdünnung stellt ein einfaches Mittel dar, um Hemmstoffe, die in geringen Konzentrationen vorkommen, zu eliminieren. Die Sensitivität des Nachweises nimmt gleichzeitig dem Verdünnungsfaktor entsprechend ab (LANTZ et al., 1994). TSAI und OLSON (1991) detektieren durch die Verdünnung  $2 \times 10^5$  cfu (colony- forming units) *E. coli* pro Gramm Erde, in der als Hemmstoffe Huminsäuren enthalten sind. VOLOSSIOUK et al. (1995) verdünnen die DNA vor der PCR um den Faktor 50, um eine schwächere Konzentration der in der Erde vorhandenen Huminsäuren zu erreichen. LANTZ et al. (1997) beschreiben, daß Kotproben nach 1000facher Verdünnung in Wasser die PCR immer noch hemmen.

### **Immunologische Anreicherung**

Die immunomagnetische Separation ist eine Technik, mit deren Hilfe sich Organismen (eukaryotische Zellen und Prokaryoten), Organellen oder Moleküle (z. B. DNA) aus den unterschiedlichsten Proben isolieren lassen (OLSVIK, 1994). Ursprünglich wurde sie zur Isolierung von Blutzellen entwickelt (OWEN, 1983). Magnetische Partikel (beads) sind dabei mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, Lektinen oder Agglutininen (SAFARIK et al., 1995) beschichtet.

Die mit Antikörpern beschichteten Partikel binden an den nachzuweisenden Mikroorganismus und werden mit einem Magneten von der übrigen Lösung getrennt. Häufig werden die Magnetpartikel der Firma Dynal (Dynabeads) verwendet. FRATAMICO et al. (1992) isolieren mittels Dynabeads M-450 Sheep anti- Mouse IgG *E. coli* O157:H7 aus Fleisch und Hundefutter. WIDJOJOATMODJO et al. (1991, 1992) und FLUIT et al. (1993) verwenden die immunomagnetische Separation zur Isolierung von Salmonellen. Die Magnetpartikel mit den gebundenen Salmonellen werden für 5 Min. bei 100 °C gekocht und anschließend zentrifugiert. In die PCR werden anschließend 5 µl der DNA- Lösung eingesetzt. (Für die Isolierung von *Bacillus anthracis* mit der immunomagnetischen Separation s. Pkt. 2.2.2.) LUK et al. (1997) bearbeiten Kotproben für den Nachweis von Salmonellen. Sie isolieren die Salmonellen aus den Kotproben mittels immunomagnetischer Separation (IMS). Dabei werden mit Antikörpern beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads, Fa. Dynal, Norwegen) verwendet. Die Salmonellen aus den Kotproben binden an die beschichteten Dynabeads und werden aus der Suspension heraus von einem Magneten angezogen. Der Überstand mit den Hemmstoffen wird entfernt. Die Sensitivität des Nachweises wird durch das Entfernen der Hemmstoffe wie Bilirubin und Gallensäuren um das 100 bis 1000fache erhöht.

## **2.4 Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)**

Die DNA Extraktion ist in die Lyse der Bakterien und in die Isolierung und Reinigung der DNA untergliedert.

### 2.4.1 Lyse

Voraussetzung für die Gewinnung hochmolekularer, intakter DNA ist ein möglichst schonender Aufschluß der Zellwand. Generell kann eine Lyse von Bakterien physikalisch durch Hitze, Frier- Tau Zyklen, mechanisch z. B. durch Zerreiben, chemisch mit Detergenzien wie SDS oder Triton X-100 oder enzymatisch z. B. mit Lysozym erreicht werden. Meist werden enzymatische, chemische oder physikalische Methoden miteinander kombiniert. Generell ist die Lyse von Gram negativen Bakterien einfacher als die Lyse von Gram positiven Bakterien.

Eine einfache und schnelle Art der Lyse ist das Erhitzen. JOHNS et al. (1994) setzen die DNA aus *Bacillus anthracis* durch Kochen frei und verwenden sie dann für die PCR. AFGHANI und STUTMAN (1996) vergleichen eine konventionelle Art der DNA Präparation mit Lysozym und Kieselerdepartikeln mit der Gewinnung von DNA aus *Mykobakterium tuberculosis* durch Kochen und stellen fest, daß das Kochen sich weder nachteilig auf die Spezifität noch auf die Sensitivität auswirkt. GLÖCKNER (1996) gewinnt DNA aus Kolonien von *Bacillus anthracis* sowohl durch Kochen, als auch durch Erhitzen in der Mikrowelle. Mit Hilfe der Mikrowelle wird auch DNA von Viren, Bakterien, Pilzen, aus Blut, aus Haarschäften und aus in Paraffin eingebettetem Gewebe gewonnen (BOLLET et al., 1991; CHEYROU et al., 1991; GOODWIN und LEE, 1993; OHHARA et al., 1994 und BANERJEE et al., 1995). Chelex® 100 (Bio- Rad) ist ein chelatbildendes Harz, das eine hohe Affinität zu polyvalenten Metallionen besitzt. Die Anwesenheit des Harzes beim Kochen schützt die DNA durch die Chelatisierung von Metallionen. Diese dienen als Katalysatoren beim Abbau von DNA bei hohen Temperaturen in Lösungen mit einer niedrigen Ionenstärke (CANO et al., 1993 und BERNAL et al., 1997). Interessant ist auch die Tatsache, daß das Erhitzen gleichzeitig zur Inaktivierung von Hemmstoffe im Serum von Patienten führt (LANTZ et al., 1994).

SJÖSTEDT et al. (1997) gewinnen DNA von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben indem sie die Proben mit PBS mit 1 % Polyvinylpyrrolidon vermischen und vor der eigentlichen Lyse dreimal gefrieren und wieder auftauen. MORE et al. (1994) vergleichen die Lyse mit 3 Frier-Tau- Zyklen und SDS mit der Lyse durch den zusätzlichen mechanischem Zellaufschluß mit Kieselgel bzw. Zirkonia Kügelchen (beads) in einem sogenannten Bead- beater und stellen dabei fest, daß die Ausbeute an DNA aus Bodenproben mit der mechanischen Lyse größer ist. YEATES et al. (1997) vermischen die Erdproben mit einem Lysepuffer und inkubieren die Proben mit Glaskügelchen in einem Bead Beater für 2 Minuten. Nach Zusatz von SDS wird die Probe für weitere 5 Sekunden im Bead Beater inkubiert. Die Lyse wird für eine Stunde bei 65 ° C fortgesetzt, die Probe wird zentrifugiert, der Überstand gewonnen und das Pellet erneut für 10 Min mit dem Extraktionspuffer bei 65 ° C inkubiert.

Ein mechanischer Aufschluß der Bakterien wird bei VOLOSSIOUK et al. (1995) durch Verreiben der Erdproben in flüssigen Stickstoff erreicht. Verluste durch Adsorption werden durch den Zusatz von Magermilchpulver eliminiert. Anschließend erfolgt eine weitere Lyse durch Zusatz von SDS. OGRAM et al. (1987) lysieren Bakterien aus Erdproben zunächst mit SDS und vervollständigen die Lyse anschließend mechanisch mit Glaskugeln in einem Bead-beater. HANSEN (1974) schließt lysozymresistenten *Bacillus cereus* durch mechanische Zerstörung mit einer Hochdruckpresse auf. Zur Lyse von *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, und *Bacillus anthracis* kombiniert SPÄTH (1989) eine mechanische Zellzerstörung durch Homogenisieren mit der Methode von HANSEN (1989). Den Kulturen von virulenten Stämmen von *Bacillus anthracis* setzt sie zusätzlich 90 Minuten vor der Zellernte Penicillin oder Ampicillin zu. Nach der mechanischen Zellzerstörung mittels Gasperlen und Homogenisator extrahieren ASH et al. (1991) RNA aus *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus subtilis*.

Für die chemische Lyse von Gram negativen Bakterien genügt oft schon der Zusatz eines Detergenz wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X- 100 (MARMUR, 1961; JOHNSON, 1981; MONSEN et al., 1983; KENNEDY et al., 1989 und SAMBROOK et al., 1989). Eine Verbesserung kann durch den Zusatz von einigen Enzymen erreicht werden. So werden häufig Pronase, Proteinase K und Lysozym eingesetzt (MARMUR, 1961; JOHNSON, 1981). VAN HUYNH et al. (1989) verwenden Dimethylsulfoxid (DMSO) bei Gram negativen und bei Gram positiven Keimen. PITCHER et al. (1989) lysieren Gram negative Zellen mit Guanidium Thiocyanat, was gleichzeitig den Abbau der DNA durch DNAsen verhindert. Mittlerweile existiert eine große Anzahl von unterschiedlichen Vorschriften für die effiziente Isolierung von hoch gereinigter DNA aus Gram negativen Bakterien (MOORE, 1989; BERGER und KIMMEL, 1987; DAVIS et al., 1986 und MANIATIS et al., 1982). Diese Vorschriften lysieren die Zellen in der Regel durch Proteinase K in Anwesenheit von SDS.

Im Vergleich zu Gram negativen Bakterien ist die Lyse von Gram positiven Bakterien schwerer nachzuvollziehen (EZAKI und SUZUKI, 1982; FESTL et al., 1986; HEATH et al., 1986; GOLDENBERGER et al., 1995) und es erfordert eine besondere Behandlung, um sie der Lyse mit SDS zugänglich zu machen. Dies kann durch eine Inkubation mit zellwandspezifischen Enzymen geschehen. Einige Autoren setzen hier Lysozym ein (MARMUR, 1961; SOMERVILLE und JONES, 1972 und BIRNBOIM und DOLY, 1979). JONES et al. (1989) und KOHLBRECHER et al. (1990) verwenden zusätzlich Lysostaphin. Achromopeptidase wird von EZAKI und SUZUKI (1982) und von BLUMENSTOCK (1984) eingesetzt. MONSEN et al. (1983) und PALVA et al. (1988) kombinieren erfolgreich Lysozym mit Mutanolysin. LEWINGTON et al. (1987) empfehlen eine Behandlung mit Aceton zum Zellaufschluß. Auch osmotische Verfahren mit Saccharose und Polyethylenglykol sind beschrieben. Der Zusatz von Penicillin (SEKI et al., 1978) verbessert die Lyse mit SDS und Lysozym.

BLANCHARD et al. (1994) inkubieren Hefezellen mit einem Hefe lysierendem Enzym (yeast lytic enzyme) und entfernen so große Anteile der Zellwand (Sphäroplastengeneration), so daß die zurückbleibenden Protoplasten mit Proteinase K lysiert werden können. LING et al. (1995) inkubieren die Hefezellen mit dem Enzym Zymolase und erreichen so eine Sphäroplastengeneration. Auch BUHARIWALLA et al. (1995) entfernen die Zellwände von *Plasmidiophora brassicae* durch die Einwirkung von Novozym, Glucanex und Chitinase, um eine Lyse zu ermöglichen.

Bazillen stellen besondere Anforderungen an ihre Lyse: MIKESSELL et al. (1983) und UCHIDA et al. (1985) benutzen einen Lysepuffer mit 20 % Saccharose, 10,5 mg/ml Lysozym, worauf sich eine Behandlung mit 5,25 % Sarkosyl und Proteinase anschließt. *Bacillus subtilis* wird von PALVA et al. (1988) mit Mutanolysin lysiert. MAKINO et al. (1993) lysieren *Bacillus anthracis* mit 10 g/ml Lysozym und SDS. MISTELE (1992), GLÖCKNER, 1996 und BEYER (1995) entscheiden sich für eine Lyse mit Lysozym, Mutanolysin und SDS. SJÖSTEDT et al. (1997) lysieren *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit einer Kombination aus Mutanolysin, Lipase und Proteinase K.

CARL et al. (1992) und REIF (1994) arbeiten nach dem Rezept von MANIATIS et al. (1989) zur Gewinnung von Plasmid- DNA aus E. coli. BONDE und JACKSON (1971) setzen der Kultur vor der eigentlichen Lyse Antibiotika zu. MISTELE (1992), BEYER et al. (1995), GLÖCKNER (1996) und ROLOFF (1997) lysieren *Bacillus anthracis* zunächst enzymatisch mit Mutanolysin und Lysozym und setzen die Lyse dann in einem zweiten Schritt mit Proteinase K und SDS fort.

### 2.4.2 Isolierung und Reinigung der DNA.

Nach der Lyse wird die DNA in der Regel durch eine Phenol- Chloroform Extraktion gereinigt und konzentriert und anschließend mit Ethanol gefällt. Durch diesen Reinigungsschritt werden einige Hemmstoffe der PCR entfernt (LANTZ et al., 1994). MARMUR (1961) entfernt Proteine durch Chloroform- Isoamyl- Extraktion. Mit Phenol werden die Proteinreste zunächst aus der wäßrigen Phase extrahiert. Anschließend werden die Phenolreste mit Chloroform, dem Isoamylalkohol zur besseren Phasentrennung beigegeben sein kann, entfernt (MANIATIS et al., 1989). Der Zusatz von Isoamylalkohol vermindert auch den Anteil von RNA in der Lösung (AMUNDSEN und NEVILLE, 1979; WALLACE, 1987). Zur Entfernung von Proteinen setzen MIDGLEY (1971) und KIRBY et al. (1967) Phenol bzw. Phenol- Kresol ein. Auch das zu Lyse eingesetzte SDS führt vor allem bei niedrigen Temperaturen zur Ausfällung von Proteinen (MARKO und BUTLER, 1951). Eine weitere Zugabe von NaCl zur Endkonzentration von 1 M verstärkt diesen Ausfällungseffekt (HEATH et al., 1986). MISTELE (1992), BEYER et al. (1995), GLÖCKNER (1996) und ROLOFF (1997) fällen die Proteine durch Inkubation der lysierten Zellen bei einer Endkonzentration von 1M NaCl mit 1 % SDS für ca. eine Stunde bei 4 °C. Das für die Lyse oder zur Fällung der Proteine eingesetzte SDS hemmt aber gleichzeitig auch die PCR und wird in der Regel durch eine Phenol- Chloroform Extraktion entfernt (MISTELE, 1992; BEYER et al. 1995; GLÖCKNER 1996 und ROLOFF 1997). GOLDENBERGER et al. (1995) setzen in der PCR 2 % Tween 20 ein, was zu einer partiellen Inaktivierung der Hemmwirkung des SDS auf die Polymerase führt, so daß auf den Schritt der Phenol- Chloroform Extraktion verzichtet werden kann. HUSS (1983) und FAHMY et al. (1985) vermindern den Proteinanteil durch Zugabe von Proteinase K. Proteinase K muß vor der PCR durch Hitze inaktiviert werden, weil sie die Polymerase hemmt (LANTZ et al., 1994).

Durch Ethanol- Perchlorat wird die DNA gefällt und die Proteine bleiben in der Lösung (KOHLEBRECHER et al. , 1990). METZENBERG und BAISCH (1981) beschreiben, daß die Proteine durch die oxidative Wirkung von Perchlorat denaturiert werden und dadurch in der Lösung bleiben. Die DNA wird dagegen durch das Ethanol gefällt und befindet sich nach der Zentrifugation im Sediment.

Zur Entfernung von Polysaccharidverunreinigungen wird Norit A oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) eingesetzt (BELLAMY und RALPH, 1968; HILL et al., 1972 und SJÖSTED, 1997).

Ribonukleinsäure (RNA) wird durch enzymatischen Abbau durch Ribonukleasen entfernt.

Zur Fällung der Desoxyribonukleinsäure wird im Allgemeinen Ethanol in Verbindung mit Salzen und tiefen Temperaturen oder Isopropanol verwendet (WALLACE, 1987; MANIATIS et al., 1989). Die Wahl des Salzes richtet sich nach der Art der Probe und der beabsichtigten Verwendung der DNA- Lösung. In der Regel wird 0,3 M Na Acetat als Basismethode zur Fällung von DNA eingesetzt. Um bevorzugt Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) zu gewinnen, wird 2,5 M Ammoniumacetat verwendet. 0,8 M LiCl fällt nicht zusammen mit der DNA aus und durch 0,2 M NaCl bleiben Detergenzien wie SDS in Lösung, so daß sie nicht mit der DNA präzipitieren. Der Vorteil der Fällung der DNA mit Isopropanol gegenüber Ethanol liegt in dem kleineren Probenvolumen.

OGRAM et al. (1987) führen mit der DNA- Lösung eine Kältefällung mit Kaliumacetat durch. Kaliumacetat erleichtert die Fällung von Erdproteinen und Lipiden. Den verbleibenden Überstand reinigen sie durch eine CsCl- Ethidumbromid Dichtegradientenzentrifugation und anschließende Hydroxyapatitchromatographie. Die CsCl- Dichtegradientenzentrifugation ist aber eine zeitaufwendige und mit gefährlichen Chemikalien verbundene Methode, die in den letzten Jahren nicht mehr verbreitet ist und durch andere Methoden ersetzt werden konnte (MACK et al., 1996). Durch Bindung der DNA an Glaskügelchen kann die DNA durch

Zentrifugation von den Hemmstoffen in der Lösung gereinigt werden. Die an die Glaskügelchen gebundene DNA kann gewaschen und anschließend wieder von den Glaskügelchen eluiert werden (LANTZ et al., 1994). BOYLE et al. (1995) beschreiben, daß an Stelle der Glaskügelchen wesentlich preisgünstigere Partikel aus Kieselerte verwendet werden können. TREVOR et al. (1994) gelingt die Reinigung der DNA durch Bindung an mit Carboxylgruppen beschichtete magnetische Partikel (SPRI, solid-phase reversible immobilization). Die an die Partikel gebundene DNA kann im Anschluß an die magnetische Separation nach entsprechenden Waschschritten wieder von den Partikeln eluiert werden. ERB et al. (1993) reinigen die aus stark verschmutztem Sediment gewonnene DNA mittels Gelfiltration über eine Sephadex G- 200 Säule. Sie stellen dabei keine großen Verluste oder Defragmentation der DNA fest und die DNA- Lösung wird optisch sauber. HOLBEN et al. (1988) setzen bei der Isolierung von Bakterien Polyvinylpyrrolidon (PVPP) ein. Das unlösliche PVPP soll Huminsäuren und andere phenolische Verunreinigungen durch Adsorption binden. Auch PICARD et al. (1992) verwenden PVPP direkt im Lysepuffer. Eine weitere Reinigung der DNA erfolgt mit einer dreifachen Passage durch Elutip- d- Säulen (Ionenaustauschersäulen, Hersteller in der Literaturstelle nicht erwähnt). YOUNG et al. (1993) reinigen aus Bodenproben isolierte DNA durch Gelelektrophorese über Nacht in einem Gel, bestehend aus 1,25 % Low Melting Ultra Pure Agarose (LMP) mit 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP). Der Reinigung der DNA- Lösung mit dem PVP Agarosegel sind allerdings Grenzen in Hinblick auf die Höhe der Hemmstoffkonzentration gesetzt. TEBBE und VAHJEN (1993) reinigen die aus Bodenproben isolierte DNA durch Ionenaustauschersäulen (Quiagen Tip 500, Quiagen). Die braune DNA- Lösung wird im Anschluß an die Passage durch die Säule optisch rein. Mit dieser Reinigungsmethode werden 97 % der Hemmstoffe entfernt. Wird die gegenüber Huminsäuren relativ unempfindliche Taq-Polymerase verwendet und dem PCR Ansatz T4 Gene 32 Protein zugesetzt, so gelingt der Nachweis von 10 Zellen von *Hansenula polymorpha* pro Gramm Erde. T4 Gene 32 Protein stabilisiert die Einzelstrang DNA während der Phase des Annealings. SJÖSTEDT et al. (1997) binden die DNA im Anschluß an die Phenol Chloroform Extraktion an Glasmilchpartikel und reinigen sie durch Waschschrritte. Ein positiver Nachweis von *Bacillus anthracis* wird erst erreicht durch eine unspezifische Vermehrung von DNA Fragmenten aus der DNA- Lösung in einer generate PCR und eine anschließende Vermehrung durch spezifische Primer. Die Nachweisgrenze beträgt  $10^3$  bis  $10^4$  Milzbrandbakterien aus 100 g Erde. PORTEOUS et al. (1997) entfernen die Erdproteine und Lipide durch ein Fällung der DNA mit Kaliumacetat und verwenden im gleichen Schritt Polyethylenglykol zur Bindung der Hemmstoffe. Sie setzen einen DNA Glykogen Carrier (Boehringer Mannheim) ein, der an die DNA bindet, um die DNA Verluste gering zu halten. Die im Erdboden reichlich vorhandenen Polysaccharide aus Pflanzen und Pilze werden anschließend mit CTAB gefällt. Proteine werden mit Chloroform entfernt. Die anschließend mit Isopropanol gefällte DNA wird von den restlichen Verunreinigungen über ein Mikrosieb, Microcon- 100™ gereinigt, dabei wird doppelsträngige DNA, die größer ist als 125 Nukleotide zurückgehalten, während Huminsäuren und andere Verunreinigungen ausgefiltert werden.

In zunehmenden Maße sind einfach durchzuführende Kits für die DNA Präparation und Reinigung kommerziell erhältlich. MACK (1996) verschafft einen Überblick über diese Kits: Ein Kit wie der Puregene DNA Isolation Kit (Biozym) isoliert DNA aus Blut, Zellkulturen, Bakterien oder Hefen in ca. einer Stunde über eine Salzpräzipitation. DNA- zol (Life Technologies), ein Guanidin und Detergenzien enthaltender, kommerziell erhältlicher Lysepuffer beschleunigt die DNA Präparation. Der QUICK- Geno genomic isolation kit (Clontech) benutzt Kügelchen aus Kieselerte zur Separation der DNA von den anderen Zellbestandteilen. Mit dem Plant DNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim) wird speziell die Isolierung von DNA aus Pflanzen erleichtert. Das Generation DNA Purification System (Gentra Systems) ermöglicht das rasche Reinigen von DNA aus Geweben oder Flüssigkeiten

wie Blut. IRWIN et al. (1996) benutzen das Sammelpapier und die Waschlösungen des Generation DNA Purification System zur Reinigung und Isolierung von DNA aus der Spülflüssigkeit der Maulhöhle von Mäusen. JOWATNY et al. (1995) isolieren *Bacteroides fragilis* aus klinischen Proben mit dem Sepa Gene kit (Sanko junyaku).

FANGAN et al. (1994) verwenden zur Isolierung von DNA aus Pflanzen und Algen den Green Gene™ Plant DNA Isolation Kit (Clontech). CERE et al. (1996) gewinnen DNA aus den Sporozoen von Eimerien aus Kotproben mit dem Gene Fizz purification Kit (Eurobio). Im Anschluß an die Lyse reinigen MORE et al. (1994) die DNA- Lösung über eine Spin Bind Patrone (FMC Bioproducts). Die DNA wird dabei in Anwesenheit von chaotropischen Salzen an eine feinporige Kieselgelmembran gebunden und wird nach entsprechenden Waschschrinen mit Wasser von der Membran eluiert. Die kommerziell erhältlichen Kits vermindern den Arbeitsaufwand erheblich.

### 2.4.3 Qualitätskontrolle der DNA

Zur Reinheitskontrolle wird üblicherweise die spektrophotometrische Messung bei 230, 260 und 280 nm Wellenlänge durchgeführt. Nach MARMUR (1961) ergeben sich hierbei für hochreine DNA- Lösungen für die Absorptionswerte folgende Quotienten:  $A_{230} : A_{260} : A_{280} = 0,45 : 1 : 0,515$ . MÜLLER et al. (1993) geben für reine DNA ein Verhältnis von  $A_{260} : A_{280} = 1,7- 2,0 : 1$  an, was in obiger Formel  $1 : 0,50- 0,588$  ergibt. MANIATIS et al. (1989) bezeichnen DNA als rein, wenn der Meßwert bei 260 nm das 1,8fache des Wertes bei 280 nm erreicht. Dies entspricht dem Wert 0,55 für  $A_{280}$  in der Formel von MARMUR (1961). Ist der Meßwert bei 230 nm erhöht, spricht das für eine Verunreinigung mit Polysacchariden. Eine Erhöhung bei 280 nm läßt auf aromatische Verbindungen schließen, in diesem Falle Proteinverunreinigungen (aromatische Aminosäuren) oder Phenolreste. Übersteigt der Wert bei 260 nm dieses Verhältnis, so liegen Reste von RNS vor. Um den DNS- Gehalt in einer Lösung zu bestimmen, wird der bei 260 nm ermittelte Absorptionswert für doppelsträngige DNA mit 50 multipliziert. Der erhaltene Zahlenwert gibt die Konzentration in µg/ml an (MANIATIS et al., 1989).

Die Intaktheit der DNA läßt sich mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel leicht kontrollieren. Bei Zugabe von Ethidiumbromid interkaliert dieses in die Doppelhelix, deutlich schwächer auch in RNS- Stränge, und macht sie in UV- Licht als leuchtende Bande sichtbar (MANIATIS et al., 1989).

### 2.5 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR werden Mikroorganismen, unabhängig von der Ausbildung charakteristischer morphologischer Merkmale, auf genomischer Ebene nachgewiesen. Voraussetzung ist, daß zumindest die Sequenzen der Primerbindungsstellen auf der nachzuweisenden DNA bekannt sind. Die PCR ist eine in verschiedenen wissenschaftlichen und diagnostischen Bereichen etablierte Technik, z. B. in der Grundlagenforschung, der Forensik, der Archäologie und in großem Maße auch in der Routinediagnostik von Infektionskrankheiten und Mikroorganismen aus Umweltproben (BESSESEN et al., 1990; DENEER und BOYCHUK, 1991; WANG et al., 1992; BUBERT et al. 1992; KUREISHI und BRYAN, 1992; PICARD et al., 1992; IBRAHIM et al., 1992 und BRUCE et al., 1992).

### 2.5.1 Grundlagen der PCR

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) ist ein In vitro- Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Im Prinzip beruht diese Anreicherung auf der Eigenschaft der DNA-Polymerasen, die als Substrat einen kurzen doppelsträngigen Bereich erkennen, dessen freies 3'OH Ende sie als Startpunkt für das Aufpolymerisieren des Einzelstranges zum Doppelstrang brauchen. Erstmals wurde diese Methode von MULLIS und FALOONA (1987) veröffentlicht.

In der PCR wird zunächst die zu amplifizierende DNA (Template- DNA) durch Erhitzen denaturiert. Die im Überschuß vorhandenen Primer lagern sich unter geeigneten Bedingungen anschließend an die einzelsträngige DNA an und es entsteht ein Hybridmolekül zwischen der einzelsträngigen DNA und dem Primer, das als Startpunkt für die Polymerase dient. Die Primer stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz und sind strangspezifisch, d. h. sie sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA Stränge. Die DNA Polymerase vervollständigt das Einzelstrang- Template ausgehend von dem anhybridisierten Primer zu einem Doppelstrang. Dabei ist für jeden der beiden Einzelstränge ein komplementärer Primer vorhanden. Um den zwischen den beiden Primern liegenden Abschnitt zu vermehren, werden die Doppelstränge erneut denaturiert und im nächsten Zyklus werden die Einzelstränge wiederum nach Anlagerung der Primer von der Polymerase zu Doppelsträngen vervollständigt. Dadurch kommt es in jedem Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der ursprünglich vorhandenen DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven etwa  $10^6$ -  $10^8$ fachen Anreicherung der durch die Primer flankierten DNA- Sequenz (IBELGAUFFTS, 1990). Für die Reaktion wird heute im allgemeinen anstelle der aus E. coli stammenden DNA- Polymerasen eine hitzestabile DNA- Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt (Taq- Polymerase). Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum von über 70 °C und ist kurze Zeit bei Temperaturen bis zu 95 °C stabil. Im gleichen Reaktionsansatz können die DNA- Einzelstränge also denaturiert werden, ohne daß das Enzym zerstört wird und nach jedem Reaktionsschritt erneut zugegeben werden muß. Ein weiterer Vorteil der Taq- Polymerase gegenüber anderen DNA- Polymerasen ist die wesentlich höhere Prozessivität. Hierdurch ist es möglich, von PCR-Primern flankierte DNA- Fragmente mit einer Länge von mehreren Kilobasen zu amplifizieren. Damit konnte die Reaktion automatisiert werden (SAIKI et al., 1988; EHRLICH et al., 1991). Ausgewertet wird die PCR in der Regel mittels Gelelektrophorese. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches sind die amplifizierten DNA- Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA- Bereiche bzw. überschüssiger dNTPs zu erkennen.

### 2.5.2 Anwendung der PCR

Die Technik der PCR ist universell einsetzbar und wird auf vielen Gebieten angewendet:

- Amplifikation von DNA- Bereichen
- cDNA- Klonierung
- Anlage von cDNA Genbanken
- DNA Footprinting
- DNA Sequenzierung
- Gen- Diagnostik
- Isolierung von DNA- Fragmenten

- Markierung von DNA- Fragmenten
- Mutagenisierung von DNA- Bereichen
- DNA Amplification Fingerprint (DAF)
- Differential Display
- Transcript- Sequenzierung

In der mikrobiologischen Diagnostik finden vor allem zwei Bereiche der PCR Anwendung. Die Amplifikation von bestimmten DNA- Bereichen als Nachweis für die Anwesenheit des Krankheitserregers und die Herstellung und Markierung von Nukleinsäuresonden für den Nachweis in der DNA- DNA Hybridisierung bzw. für den Nachweis des PCR Produktes in einer nachfolgenden Hybridisierungsreaktion selbst.

In der Bakteriologie dient die PCR hauptsächlich zum Nachweis von Krankheitserregern in klinischen Proben, Lebensmittel- und Umweltproben.

CARL et al. (1992), TURNBULL et al. (1992), HUTSON et al. (1993), MAKINO et al. (1993), JOHNS et al. (1994), PATRA et L. (1994), REIF et al. (1994), BEYER et al.(1995), RAMISSE et al. (1995 und 1996) und GLÖCKNER (1996) weisen *Bacillus anthracis* mit der PCR nach.

BEJ et al. (1991) weisen mit der PCR coliforme Keime, *Escherichia coli* und *Shigella spp.* in Wasserproben nach. *Legionella spp.* werden von KOIDE et al. (1993) mit der PCR nachgewiesen. BESSESEN et al. (1990), DENEER und BOYCHUK (1991) und FLUIT et al. (1993) weisen mit der PCR *Listeria monocytogenes* nach. PCR amplifizierte *Mycobacterium leprae*- DNA weisen VLIET et al. (1993) in einem Mikrotiterhybridisierungsassay nach. JOSEPHSON et al., 1991 weisen fäkale *E. coli* in aus Erde mittels PCR nach. THIERRY et al. (1993) beschreiben den Nachweis von *Mycobacterium avium* aus der Kultur mittels PCR. DELACOURT et al. (1995) weisen *Mycobacterium tuberculosis* aus klinischen Proben direkt mit der PCR nach. GOLBANG et al. (1996) detektieren zirkulierende pathogene Bakterien direkt aus Blutproben.

Viele andere Krankheitserreger werden ebenfalls mit der PCR nachgewiesen, z. B. *Mycoplasma pneumoniae* (LÜNEBERG et al., 1993), *Vibrio parahaemolyticus* (TADA et al., 1992), *Vibrio cholerae* (KOCH et al., 1993), *Yersinia enterocolitica* (IBRAHIM et al., 1992; NAKAJIMA et al., 1992 und KAPPERUD et al., 1993), *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* (KWAGA et al., 1992) und *Salmonella spp.* (MEIXNER, 1995).

Weitere Anwendungsgebiete der PCR sind z. B. das Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) (STEFFAN und ATLAS, 1988 und BLANCHARD und NOWOTNY, 1994) und das Monitoring extrazellulärer DNA in der Umwelt (ROMANOWSKI et al., 1993; RECOBERT et al., 1993)

### 2.5.3 Faktoren, die die PCR beeinflussen

Die PCR ist eine sehr sensible Technik, die von vielen Faktoren beeinflusst wird, wie z. B. der Temperatur, den Reaktionskomponenten, der Template DNA und den Primern. Alle diese Komponenten müssen jeweils optimal an die PCR angepaßt und anschließend konstant gehalten werden, um ein reibungsloses Ablaufen des Nachweises zu ermöglichen.

#### 2.5.3.1 Temperatur

Zu Beginn der PCR wird die Ziel- DNA (Template) denaturiert, d. h. in ihre Einzelstränge zerlegt. Die Temperatur, die für die Denaturierung erforderlich ist, richtet sich nach der Basenzusammensetzung der DNA. Je höher der Gehalt an Cytosin und Guanin ist, desto

höher ist auch die Temperatur für die Denaturierung der DNA. Die Ursache hierfür liegt darin, daß zwischen Cytosin und Guanin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden und daß damit die Bindungsenergie zwischen diesen Basen größer ist, als zwischen Adenin und Thymin, die durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Hohe Temperaturen für die Denaturierung beeinträchtigen die Lebensdauer der Polymerase.

Nach der Denaturierung muß auf die Annealingtemperatur gekühlt werden. Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Anhybridisierung der Primer. In Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der Primer kann die optimale Temperatur für das Annealing nach folgender Formel (SUGGS et al., 1981) berechnet werden:

$$T_a = T_m - 5 \text{ °C} = 2 (A + T) + 4 (G + C) - 5 \text{ °C}$$

Je höher die Annealingtemperatur gewählt wird, um so eher wird ein Anlagern der Primer an eine falsche Stelle des DNA- Einzelstranges (Mispriming) verhindert und die Spezifität der PCR steigt (BEJ et al., 1991).

Im Anschluß an das Annealing der Primer werden die Einzelstränge durch die DNA-Polymerase in Verlängerung des Primers am Matrizenstrang zu Doppelsträngen vervollständigt (Extension). Das Temperaturoptimum für die Taq- Polymerase beträgt 72 °C.

Nach dem letzten Zyklus, üblich sind 20 bis 50 Zyklen, erfolgt die vollständige Renaturierung der DNA bei 72 °C oder 73 °C, danach kann der Reaktionsansatz bis zur Auswertung auf Zimmertemperatur oder auf 8 °C gekühlt werden. Die Dauer für die einzelnen Reaktionsschritte hängen vom Thermocycler ab, ob die Temperatur der Blöcke gemessen und kontrolliert wird oder ob das Gerät die Temperatur in den Reaktionshütchen konstant hält. Für die Amplifikation von DNA- Fragmenten, die größer als 1 kb sind, kann der Primerextensionsschritt 1- 7 Minuten , abhängig von der Länge der Ziel- DNA, betragen (JEFFREYS et al., 1988).

VEKRIS et al. (1995) erleichtern den Einbau von Digoxigenin- dUTP in das PCR Produkt dadurch, daß sie die Phase der Extension auf 3 Minuten verlängern.

Für die Vermehrung der großen PCR- Fragmente wird für die sogenannten PCR Fingerprint- Techniken ein Zeitincrementsegment in der Extensionsphase eingefügt, so daß der Polymerase pro Zyklus jeweils zusätzlich eine bestimmte verlängerte Reaktionszeit gewährt wird, um Ermüdungserscheinungen des Enzyms auszugleichen, die pro Zyklus durch das regelmäßige Erhitzen auf über 90 °C während der Phase der Denaturierung zunehmend auftreten (BEYER, pers. Mitteilung).

### 2.5.3.2 Reaktionskomponenten

Zusätzlich zur Ziel- DNA, den Primern und der Taq- Polymerase (1- 2,5 Einheiten) enthält ein Reaktionsansatz einen Standard Reaktionspuffer, bestehend aus: 50 mM KCl, 10 mM Tris- HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 100 µg/ml Gelatine. Die optimale Magnesiumkonzentration schwankt zwischen 1 bis 10 mM und muß durch Versuche für jede PCR im Einzelnen ermittelt werden. Die Polymerase arbeitet magnesiumabhängig, bei zu wenig freiem Magnesium im Reaktionsansatz findet keine Amplifikation statt und bei zu viel freiem Magnesium treten unerwünschte Amplifikationen auf (WILLIAMS, 1989).

Die Konzentration der Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), bestehend aus gleichen Teilen von dATP, dGTP, dCTP und dTTP, beträgt 200 µM. Konzentrationen größer als 50 mM dNTP hemmen die Taq- Polymerase (INNIS et al., 1988).

Um die Verdunstung und damit die Änderung der Konzentrationen der Reaktionskomponenten, insbesondere während der Denaturierungsphase zu verhindern, wird der Ansatz mit flüssigem Paraffin, leichtem Mineralöl oder, bei der Hot- start Technik,

Wachskügelchen überschichtet. Bei dieser Art von Hot-start Technik ist das freie Magnesium für die Reaktion in den Wachskügelchen enthalten und wird erst beim Schmelzen der Kügelchen freigesetzt, so daß die Reaktion erst nach dem Schmelzen beginnt.

Wird in der PCR DNA mit einem hohen Gehalt an Cytosin und Guanin verwendet, kann dies zu einer unzureichenden Denaturierung und in Folge hiervon zu einem Anlagern der Primer an eine falsche Stelle (Mispriming) führen. Daher werden als Zusatzstoffe denaturierende Substanzen wie Formamid 1,25- 5 % eingesetzt (SARKAR et al., 1990). Dies führt zu einer wesentlichen Verbesserung der Spezifität. McCONLOGUE et al. (1988) ersetzen 75 % der dGTP durch ein strukturdestabilisierendes Basenanalogen 7- deaza- 2'- deoxyguanosin 5'-triphosphat (dc<sup>7</sup>GTP) und erreichen dadurch eine Erhöhung der Spezifität bei der Amplifikation von Template- DNA mit einem GC- Gehalt von 74 %. HUNG et al. (1990) verwenden zur Steigerung der Spezifität der PCR Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$ -  $1 \times 10^{-5}$  M, dadurch werden Unterschiede in der Schmelztemperatur der Primer ausgeglichen. Durch Einsatz von 5- 20 % Glycerol in der Reaktionslösung steigern SMITH et al. (1990) die Ausbeute an PCR- Amplifikat. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Amplifikationsrate in der PCR ist die Verwendung von T4 Gene 32 Protein, welches zur Stabilisierung von Einzelstrang- DNA dient und dadurch ein verbessertes Primer- Annealing ermöglicht (PANACCIO und LEW, 1991; WIDJOATMODJO et al., 1992; TEBBE und VAHJEN, 1993; BEYER et al., 1995 und GLÖCKNER, 1996). PONCE und MICOL (1992) verbessern die Amplifikation von langen DNA- Fragmenten (3kb) durch Einsatz eines Tricine- Puffers (pH 8,4 ohne KCl).

Diese Zusätze erübrigen sich bei der PCR mit *Bacillus anthracis*, da dieser einen Gehalt von Adenin und Thymin von über 70 % hat und damit die Schmelztemperatur nicht zu hoch liegt (CLAUS und BERKELEY, 1986).

### 2.5.3.3 Primer

Primer sind chemisch synthetisierte einzelsträngige Oligonukleotide, die 15 bis 30 Basen lang und komplementär zu den 3'-Enden der Ziel- DNA sind. Sie sollen nach Möglichkeit so gewählt werden, daß sie keine Sekundärstruktur aufweisen, einen GC- Gehalt von jeweils 40- 60 % haben und insbesondere am ihren 3'-Enden nicht komplementär zueinander sind. Ein Primerdimer entsteht z. B. durch Ausbildung einer Haarnadelschleifenstruktur (Loop-Struktur). Sind an der Ausbildung dieser Struktur mindestens zwei benachbarte Basen beteiligt, die Wasserstoffbrückenbindungen zu Basen innerhalb des Primers ausbilden, so stellt diese Struktur ein Substrat für die Polymerase dar. Neben der gesuchten Sequenz wird nun auch der Primer als PCR Produkt vermehrt.

Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von Primerdimeren, wenn die komplementären Basen zu den letzten 3 Basen am 3'-Ende des Primers im Gegenstrangprimer vorkommen. Auch diese Struktur dient als Substrat für die Polymerase und wird neben der gesuchten Sequenz als PCR Produkt vermehrt.

Problematisch wird es dann, wenn die gesuchte Ziel- DNA in geringen Mengen vorhanden ist, so daß die Ausbildung der Primerdimere stark überwiegt, dann werden fast ausschließlich die Primerdimere gebildet und die Sensitivität der PCR nimmt ab.

Primerdimere werden durch die Agarosegelelektrophorese als relativ deutlich begrenzte Aufhellung unterhalb des Laufpuffers sichtbar. Die wolkige Aufhellung, die von den Resten des Prämix (Primer, dNTP) gebildet wird, stellt sich im Gegensatz zu den Primerdimeren diffus dar.

Die Primer werden in der PCR in einer Konzentration von 0,1- 1  $\mu$ M eingesetzt. Die Primer sollten keine langen Mononukleotidabschnitte aus Polypurinen oder Polypyrimidinen besitzen und der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte 40- 60 % betragen, so daß beide Primer die

gleiche Schmelztemperatur besitzen. Die Primer besitzen im lyophilisierten Zustand eine Haltbarkeit von 12- 24 Monaten und im aufgelösten Zustand bei Aufbewahrung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sind sie ca. 6 Monate haltbar. Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) der Primer in der PCR sollte zwischen  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gewählt werden, um eine spezifische Anhybridisierung der Primer an das Template zu gewährleisten und sogenannte „ghost“- Amplifikate zu vermeiden. Die Annealingtemperatur kann durch Formel von SUGGS et al. (1981) anhand der Basenzusammensetzung berechnet werden.

#### 2.5.3.4 Ziel- DNA

Die Menge der Ziel- DNA, die in einer diagnostischen PCR eingesetzt wird, beträgt 0,05- 1,0  $\mu\text{g}$ . Die Sensitivität der PCR steigt mit dem Reinheitsgrad der DNA (SAIKI, 1989). Bei Anwendung der PCR zur Detektion von Mikroorganismen aus Umweltproben sind jedoch oft Substanzen enthalten, die an die Ziel- DNA während der DNA- Gewinnung binden und in Folge die Taq- Polymerase hemmen. Dies führt zu einer erheblichen Verminderung der Sensitivität der PCR. Die Konzentration der Hemmstoffe kann durch das Verdünnen der DNA- Lösung oder durch eine aufwendige Reinigung erreicht werden. Sind die Hemmstoffe jedoch an die DNA gebunden, werden sie mit gereinigt und nicht entfernt. Bei der Gewinnung von DNA aus Bodenproben werden Phenole und Huminsäuren als Hemmstoffe genannt (TSAI und OLSON, 1992), wobei phenolische Gruppen N- substituierte Amide oder Quinone ausbilden, die kovalent an die DNA binden. Huminsäuren werden beim Abbau von organischem Material gebildet, chemisch handelt es sich dabei um eine Gruppe von komplexen Polyphenolen. Huminsäuren sind in Umweltproben wie z. B. Boden- und Wasserproben ubiquitär. Die Hämgruppe des Hämoglobins und seine Derivate hemmt die Vermehrung der Ziel- DNA aus bluthaltigen Proben (HIGUCHI, 1989). Die Abbauprodukte des Häms wie Bilirubin und Gallensalze, die in Kotproben vorkommen, hemmen ebenfalls die PCR (WIDJOJOATMODJO et al., 1992). Hemmstoffe für die PCR sind in klinischen Proben, die Blut, Nasenschleim, Sperma und Kotbestandteile enthalten, zu erwarten (PANACCIO und LEW, 1991). ROSSEN et al. (1992) stellen fest, daß Lebensmittel mit konzentrierten Anteilen von Proteinen (auch hydrolysierte Proteine) und stark fetthaltige Lebensmittel einen großen Hemmeffekt auf die PCR besitzen. Der Mechanismus der Hemmwirkung ist unbekannt. Die Aktivität der Polymerase wird jedoch durch hohe Gehalte an Öl, Salz, Kohlenhydraten und Aminosäuren nicht stark beeinflusst. WEYANT et al. (1990) untersuchen die Wirkung ionischer und nichtionischer Detergenzien auf die Taq- Polymerase. Dabei stellen sie fest, daß unter anderem 0,1 % SDS in der PCR ausreicht, um das Enzym vollständig zu hemmen. ROSSEN et al. (1992) stellen eine Hemmwirkung schon bei 0,01 % SDS fest, die typische Konzentration in der DNA- Extraktionslösung wird mit 0,1- 0,2 % angegeben. Weiterhin kann auch ein zu hoher RNA- Gehalt in der DNA- Präparation die PCR hemmen (PIKAART und VILLEPONTEAU, 1993). Die Proteinase K baut die Polymerase ab und muß vor der PCR durch Hitze inaktiviert werden (LANTZ et al., 1994). Oft ist eine PCR ohne intensive Reinigung der DNA aufgrund der Hemmstoffe nicht möglich. Eine Reinigung der DNA ist aber mit einem entsprechendem Aufwand und in der Regel mit einem Verlust von Ziel- DNA verbunden. KREADER (1996) untersucht die Wirkung von T4 Gene 32 Protein und von Rinderserumalbumin (BSA) auf die Neutralisation der Hemmstoffe. Sie stellt fest, daß bei Zusatz von 400 ng pro  $\mu\text{l}$  BSA oder 150 ng T4 Gene 32 Protein pro  $\mu\text{l}$  in den Reaktionsansatz der PCR die 10 bis 100fache Menge an  $\text{FeCl}_3$ , Häm, Huminsäuren, Gerbstoffen oder Extrakten von Faeces, Süß- oder Salzwasser in der DNA- Lösung enthalten sein kann, ohne die PCR zu hemmen. Bei Gallensalzen, Bilirubin, EDTA, NaCl, SDS oder Triton X- 100 kann die Hemmwirkung durch den Zusatz von BSA oder T4 Gene 32 Protein nicht neutralisiert

werden. Eine Kombination von BSA und T4 Gene 32 Protein führt nicht zu einer Potenzierung der neutralisierenden Wirkung. SJÖSTEDT et al. (1997) setzen 1 mg BSA pro ml in der PCR ein. Der Einsatz von Taq extender (Stratagene), einer modifizierten Pfu Polymerase in Kombination mit der Taq Polymerase hat keinen Effekt auf die Neutralisation der Hemmwirkung der Huminsäuren in der DNA- Lösung aus Bodenproben (SJÖSTEDT et al., 1997). TEBBE et al. (1993) beschreiben, daß der Zusatz von T4 Gene 32 Protein die minimale Hemmkonzentration der Taq- Polymerasen für Huminsäuren von 0,05 bis 0,64 µg pro ml auf 5,12 µg pro ml anhebt. BEYER et al. (1995) setzen das T4 Gene 32 Protein für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ein. GOLDENBERGER et al. (1995) setzen 2 % Tween 20 im Reaktionsansatz der PCR ein, was zu einer partiellen Inaktivierung der Hemmwirkung des SDS auf die Polymerase führt.

## 2.6 Auftreten von Kontaminationen

Die Polymerase- Kettenreaktion ist eine starke, besonders sensitive Technik für den Nachweis von Mikroorganismen. In der PCR findet selektiv eine exponentielle Vermehrung bestimmter Nukleinsäureabschnitte statt. Die Anwesenheit einiger weniger DNA Moleküle in einem DNA- Gemisch reicht vollständig aus, um einen bestimmten Erreger nachzuweisen. Die starke Vermehrung, die die PCR so sensitiv macht, beinhaltet gleichzeitig das große Risiko, durch Kontaminationen falsch positive Ergebnisse zu erzielen.

LONGO et al. (1990) beschreiben drei verschiedene Kontaminationsquellen: Die cross over Kontamination entsteht durch den versehentlichen Transfer von Ziel- DNA direkt von einem Probengefäß zum nächsten. Eine Kontamination durch in der Laborumgebung vorkommende, rekombinante Plasmide, in denen die Ziel- DNA geklont enthalten ist, wird als Plasmidkontamination bezeichnet. Die carry- over Kontamination stellt das größte Risiko für eine Kontamination dar. Das Produkt einer PCR, daß sich bei wiederholter Durchführung des Nachweises in großen Mengen im Labor anreichern kann, dient bei der carry- over Kontamination als Basis für die nächste PCR und führt zu falsch positiven Ergebnissen.

Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen sind bei KWOK und HIGUCHI (1989) ausführlich dargestellt. Die Probenaufbereitung und die PCR werden räumlich isoliert, für beide Schritte werden die Reagenzien und Arbeitsmaterialien streng getrennt und die Arbeitsplätze werden mit UV- Licht bestrahlt, um kontaminierende DNA abzubauen.

Auch KESSLER et al. (1994) und LAGE et al. (1996) empfehlen zur Vermeidung von Kontaminationen eine strikte räumliche Separation der Arbeitsplätze für das Herstellen der Reaktionslösungen, die DNA Extraktion, die Durchführung der PCR und die Auswertung der PCR durch die Hybridisierung oder Gelelektrophorese. KELLER et al. (1990) trennen die Probenaufbereitung und die DNA Vermehrung ebenfalls räumlich. Zusätzlich verbringen sie die vermehrte DNA für den Nachweis des PCR Produktes in einen anderen Raum. KOX et al. (1994) verwenden drei Laborräume zur Vermeidung von Kontaminationen. In einem Raum werden die Lösungen für die Aufbereitung der Proben und die Reaktionslösung für die PCR hergestellt, wobei ultrareines Wasser verwendet wird und die Lösungen möglichst sterilisiert und aliquotiert werden. In den ersten Raum darf weder die DNA noch das PCR Produkt des nachzuweisenden Erregers verbracht werden. In einem zweiten Raum werden die klinischen Proben bearbeitet und die DNA wird dem Mastermix zugesetzt. Konzentrationen über 100 pg pro ml des nachzuweisenden Erregers werden in diesem Raum grundsätzlich nicht verwendet. Im dritten Laborraum findet die PCR und der Nachweis der PCR Produkte statt. Alle Arbeitsschritte werden in einer Sicherheitskabine durchgeführt und für jeden Raum sind ein eigener Arbeitskittel, eigene Handschuhe und eigene Pipetten vorgesehen.

Die Reaktionslösungen für die PCR, z. B. Wasser, 10 x Puffer, Nukleotide, Primer und die Reagenzien für die Extraktion der DNA werden portioniert (KWOK und HIGUCHI, 1989; KESSLER et al., 1994 und KOX et al., 1994).

KWOK und HIGUCHI (1989) empfehlen weiterhin, alle autoklavierbaren Reagenzien für die PCR, wie z.B. Wasser und Paraffin zu autoklavieren. Auch die Pipettenspitzen und die Reaktionsgefäße müssen autoklaviert werden. Das Tragen und frequente Wechseln von Handschuhen vermindert ebenfalls das Risiko für eine Kontamination (LÜNEBERG et al., 1993).

Ausschließlich für das Pipettieren der Positivkontrollen wird extra eine Spezialpipette verwendet. Zur Vermeidung von cross over Kontaminationen werden Pipettenspitzen verwendet, die mit einem Kolben gefüllt sind. Durch speziell leicht zu öffnende Reaktionsgefäße kann zusätzlich die Gefahr der Kontamination durch Tröpfchenbildung beim ungeschickten Öffnen der Deckel minimiert werden. Bei der Durchführung der PCR ist zu beachten, daß aus den Reagenzien für die PCR eine Vormischung (Prämix) hergestellt wird, die anschließend auf die Reaktionsgefäße verteilt wird. Die DNA wird im letzten Schritt zugesetzt.

Wichtig ist, daß ausreichend Kontrollen mit geführt werden. Positivkontrollen zeigen dabei den erwartungsgemäßen Ablauf des Versuches an und Negativkontrollen stellen einen Indikator für die Kontamination dar.

Als Positivkontrollen für die PCR verwenden KOX et al. (1994) vier DNA- Lösungen mit abnehmender DNA Konzentration. Sie verwenden außerdem zwei Negativkontrollen, die keine DNA enthalten. KOX et al. (1996) verwenden als Kontrolle über die PCR drei Positivkontrollen mit unterschiedlicher DNA Konzentration und eine Negativkontrolle ohne DNA. Als Kontrolle über die DNA Präparation setzen NOORDHOEK et al. (1995) und KOX et al. (1996) eine Negativkontrolle (Probenmaterial ohne den nachzuweisenden Erreger) pro fünf zu präparierende Proben ein. Ist diese positiv, so wird für alle positiven Proben die DNA Extraktion wiederholt, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Zusätzlich als Positivkontrollen über die DNA Extraktion werden zwei Portionen des zu untersuchenden Probenmaterials entnommen und unter Laborbedingungen gezielt mit unterschiedlichen Konzentrationen des nachzuweisenden Erregers beimpft. Sind die beimpften Proben negativ, so ist die DNA Extraktion als nicht effizient zu betrachten und muß wiederholt werden.

KELLER et al. (1990) setzen DNA einer negativen Proben als Negativkontrolle in der PCR ein. Als Positivkontrolle über die PCR dient DNA aus einem Vektorplasmid, das die Sequenz des nachzuweisenden Keimes enthält.

LEDNICKY und BUTEL (1997) setzen gentechnologisch hergestellte Plasmide als Positivkontrolle für die PCR ein. Die Plasmide enthalten zwar die Regulatorgene des *SV40* (*Simian Virus 40*), unterscheiden sich aber unter anderem durch das Vorhandensein von jeweils einem Spaltort für die Restriktionsendonukleasen Sal I und Xho I von der in der Natur auftretenden Sequenz des Erregers. Eine cross over Kontamination mit der Positivkontrolle kann durch die Spaltung des PCR Produktes mit Sal I oder mit Xho I erkannt werden.

Eine weitere Möglichkeit das Ergebnis der PCR zu kontrollieren, besteht darin, das PCR Produkt oder die DNA in der Probe zu sequenzieren. Diese Art der Kontrolle ist für die Routinediagnostik zu aufwendig, kann aber bei der Entwicklung von diagnostischen Verfahren zur Sicherung von deren Spezifität eingesetzt werden. VANDAMME et al. (1997) lassen Teile aus dem Genom des nachzuweisenden Erregers aus serologisch unbestimmbaren Proben sequenzieren, um zu beweisen, daß diese Proben nicht aufgrund einer Kontamination der PCR positiv sind. Sie stellen fest, daß das Genom des gesuchten Erregers in diesen Proben vorhanden ist, obwohl der Western blot als Standard- Diagnostik in diesen Fällen den gesuchten Erreger nicht nachweisen kann. VANDAMME et al. (1997) stellen dadurch fest, daß mit dem Western blot nicht alle Stämme des Erregers nachgewiesen werden können, weil der Western blot nicht 100 % spezifisch ist.

SARKAR und SOMMER (1990) und CIMINO et al. (1990) zerstören kontaminierende DNA in Lösungen mittels UV- Licht. Dabei werden die Reaktionsgefäße, die schon den gesamten Reaktionsansatz (Prämix, Taq- Polymerase und Paraffin) außer der Template- DNA enthalten, bei einer Wellenlänge von 254- 300 nm für 5- 20 Min. mit UV- Licht bestrahlt.

CONE und FAIRFAX (1993), beschreiben die Bestrahlung der Arbeitsflächen und Utensilien mit UV- Licht als ein weiteres Mittel, um die Kontaminationsgefahr herabzusetzen. Der größte, durch die Bestrahlung mit UV- Licht auftretende DNA- Schaden entsteht durch die Ausbildung eines Cyclobutanringes zwischen benachbarten Pyrimidinbasen. Dadurch entstehen Pyrimidindimere innerhalb eines Stranges, die die Elongation der PCR an dieser Stelle verhindern. Diese Dimerbildung ist ein reversibler Zustand, der in einem Fließgleichgewicht endet, in dem die Monomere bevorzugt auftreten. Zu einem beliebigen Zeitpunkt existieren nur unter 10 % der möglichen Dimere in einem mit UV- Licht bestrahlten DNA- Strang. Um die optimale Lichtintensität nutzen zu können, sollte die UV- Fläche senkrecht zur Lichtquelle stehen, was bei den meisten Utensilien, z. B. Pipetten, nur partiell der Fall ist, so daß nur ein Teil der Pipette optimal bestrahlt wird. Außerdem können DNA Fragmente mit anderen Sequenzen, Primer und dNTPs (Desoxyribonukleotridiphosphate) die kontaminierende DNA vor der UV- Bestrahlung abschirmen. Der Effekt der UV- Bestrahlung auf die DNA hängt auch von deren Sequenz ab, da die Anzahl der benachbarten Pyrimidinbasen wesentlich die Empfindlichkeit gegenüber UV- Licht bestimmt.

LONGO et al. (1990) untersuchen den Einsatz des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase zur Vermeidung von carry- over Kontaminationen. Durch langsame chemische Desaminierung entsteht in vivo aus Cytosin Uracil. Daraus resultiert eine C → T Transition. Das Enzym Uracil- DNA Glykosylase hat im lebenden Organismus die Funktion, Uracil rasch aus der DNA zu entfernen. Durch Spaltung der N- glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zuckerphosphatrückrat entsteht eine apyrimidinische Bindungsstelle, die sehr anfällig gegenüber saurer und basischer Hydrolyse ist. Die Replikation der DNA durch die DNA Polymerase wird an dieser Stelle gestoppt und andere Reparaturenzyme korrigieren die Sequenz und reparieren die Mutation. LONGO et al. (1990) inkorporieren dUTP in die PCR Produkte, indem sie entweder dTTP vollständig durch dUTP ersetzen, oder Primer verwenden, die Uracil statt Thymin enthalten. Die Reaktionsansätze für die PCR werden mit der Uracil- DNA Glykosylase inkubiert und die Uracil- DNA Glykosylase wird vor Ablauf der PCR Zyklen thermisch inaktiviert. Werden Primer verwendet, die Uracil an Stelle von Thymin enthalten, so werden die Primer für die nachfolgende PCR erst nach der Inaktivierung der Uracil- DNA Glykosylase zugesetzt, da sie sonst ebenfalls abgebaut würden. Das Zusetzen der Primer nach Einwirkung der Uracil- DNA Glykosylase stellt aber erneut eine Gefahr für das Einbringen von carry- over Kontaminationen durch das Öffnen der Gefäße dar. Die Uracil- DNA Glykosylase spaltet Uracil aus den in Form von PCR Produkten vorhandenen carry- over Kontaminationen und stoppt so deren Vermehrung durch die DNA Polymerase. Die nachzuweisende Ziel- DNA bleibt unversehrt und kann vermehrt werden. LONGO et al. (1990) stellen fest, daß die Hemmung der Reamplifikation durch die Uracil- DNA Glykosylase stärker ist, wenn im PCR Protokoll dUTP verwendet wird, als wenn Uracil haltige Primer verwendet werden. Die Ausbeute der PCR wird durch den Ersatz von Thymin durch Uracil nicht beeinträchtigt, bei längeren PCR Produkten kann jedoch die Sensitivität abnehmen. In der Produktinformation zur Uracil- DNA Glykosylase der Fa. Boehringer wird empfohlen, die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> in der PCR Lösung von 1,5 mM auf 2,5 mM zu erhöhen, falls der Ersatz von dUTP an Stelle von dTTP die DNA Polymerase hemmt.

KOX et al. (1994) verwenden für den Nachweis von *Mykobakterium tuberculosis* mit der PCR neue Primer. Diese lagern sich außerhalb der Region der DNA an, die von den ursprünglich benutzten Primern vermehrt wird. Eine carry- over Kontamination mit den PCR Produkten der ursprünglich verwendeten Primer, die zuvor in großen Mengen im Labor

vermehrt wurden, ist nicht möglich, da die neuen Primer sich nicht an das PCR Produkt anlagern. Um carry- over Kontaminationen weiterhin zu vermeiden, wird für die PCR mit den neuen Primern das Enzym Uracil- DNA Glykosylase eingesetzt. 1000 fg DNA von *Mykobakterium tuberculosis* werden in einer PCR (mit dUTP an der Stelle von dTTP) vermehrt. Aus dem PCR Produkt wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Je 10 µl der Verdünnungsreihe werden als Ziel- DNA in einer PCR eingesetzt. Bis zu der Verdünnungsstufe 1: 10<sup>9</sup> findet eine nachweisbare Vermehrung des PCR Produktes statt. Mit dergleichen Verdünnungsreihe werden erneut mehrere PCR durchgeführt, dabei werden die PCR Ansätze jeweils mit unterschiedlichen Mengen des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase inkubiert. KOX et al. (1994) stellen fest, daß 0,01 Einheiten Uracil- DNA Glykosylase pro PCR Ansatz (im Volumen von 50 µl) genügen, um 10 µl des unverdünnten PCR Produktes abzubauen. Sie ersetzen dTTP vollständig durch dUTP, wobei alle vier Basen zu gleichen Teilen konzentriert werden. Die Konzentration für MgCl<sub>2</sub> in der Reaktionslösung für die PCR beträgt 2 mM. Für den Abbau der carry- over Kontaminationen durch die Uracil- DNA Glykosylase wird der Versuchsansatz 5 Min. bei 50 °C inkubiert. Eine thermische Inaktivierung des Enzyms vor dem Ablauf der PCR Zyklen findet nicht statt. Als Kontrolle über die Effektivität des Abbaus von carry- over Kontaminationen durch die Uracil- DNA Glykosylase setzen KOX et al. (1994) pro PCR einen Ansatz mit 150 pg PCR Produkt (enthält Uracil an Stelle von Thymin) ein. Ist dieser PCR Ansatz positiv, so war der Abbau der carry- over Kontaminationen in dieser PCR nicht genügend. KANG et al. (1996) ersetzen dTTP ebenfalls vollständig durch dUTP. Dabei wird dUTP ein Drittel höher konzentriert eingesetzt, als die anderen Desoxynukleotidtriphosphate. Da das PCR Produkt mit einem PCR ELISA ausgewertet wird, ist zusätzlich Digoxigenin dUTP mit einer Konzentration von 10 µM in der PCR Lösung enthalten. Die Uracil- DNA Glykosylase wirkt 2 Min. bei 50 °C auf den Prämix der PCR ein und wird anschließend 10 Min. bei 95 °C inaktiviert. Pro PCR Ansatz im Volumen von 50 µl werden 0,5 Einheiten Uracil- DNA Glykosylase eingesetzt und die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> in der PCR Lösung beträgt 1,5 mM. Auch NOORDHOEK et al. (1995) ersetzen dTTP vollständig durch dUTP. Sie verwenden 0,2 bis 0,02 Einheiten Uracil- DNA Glykosylase pro PCR Ansatz in einem Volumen von 50 µl. Vor dem Ablauf der PCR Zyklen werden die PCR Ansätze für 6 Minuten bei 37 °C mit der Uracil- DNA Glykosylase inkubiert und anschließend wird das Enzym für 6 Minuten bei 94 °C thermisch inaktiviert. KESSLER et al. (1997) ersetzen dTTP vollständig durch Uracil und verwenden MgCl<sub>2</sub> in einer Konzentration von 3 mM. Inkubiert werden die PCR Ansätze für 2 Minuten bei 50 °C mit der Uracil- DNA Glykosylase.

## 2.7 Nachweis von PCR Produkten in Mikrottestplatten

Die Gelelektrophorese oder Hybridisierung (Southern- Blot – Hybridisierung bzw. Dot- Blot- Hybridisierung) sind zeit- und arbeitsaufwendige Nachweismethoden für PCR Produkte (LANDGRAF et al., 1991 und LUNGU et al. 1995). Die nested PCR zum Nachweis von PCR Produkten steigert die Sensitivität und dient zugleich als Spezifitätskontrolle (KANEKO et al., 1989; HAQQI et al., 1988; WAHLBERG et al., 1990; CARL et al., 1992). Als Routineverfahren in Diagnostiklaboratorien ist die nested PCR aber aufgrund ihrer Anfälligkeit für Kontaminationen ungeeignet. Der arbeitstechnische Aufwand, der für die Durchführung einer nested PCR erbracht werden muß, ist in der Regel zu erheblich (KWOK und HIGUCHI, 1989). In Diagnostiklaboratorien weit verbreitet und anerkannt ist z. B. die ELISA- Technik und es gibt bereits viele Ansätze, PCR Produkte mit dem Prinzip der ELISA- Technik nachzuweisen.

Das PCR Produkt wird an die Oberfläche einer Mikrottestplatte gebunden und somit immobilisiert. Prinzipiell kann dabei das PCR Produkt selbst an die Oberfläche der

Mikrotestplatte gebunden werden, oder es hybridisiert an eine DNA- Sonde (Fängersonde), die an die Oberfläche der Mikrotestplatte gebunden ist. In der Literatur werden drei verschiedene Bindungsarten beschrieben.

KELLER et al. (1990) und GIBELLINI et al. (1993) adsorbieren eine Plasmidsonde an die Mikrotestplatte und hybridisieren das PCR Produkt an die Sonde. Die Mikrotestplatte wird mit der Sonde inkubiert, dabei lagert sich die Sonde an die Oberfläche der Mikrotestplatte an. Ein anderes Prinzip ist, die Affinität von Biotin zu Streptavidin für die Bindung des PCR Produktes an die Mikrotestplatte zu nutzen. Dazu wird ein mit Biotin markierter Primer in der PCR eingesetzt. Das mit Biotin markierte PCR Produkt bindet anschließend an die Oberfläche einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotestplatte (LANDGRAF et al., 1991; LÜNEBERG et al., 1993 ; LUNGU et al., 1995; MARTIN et al., 1995; KOHSAKA et al., 1996; KOX et al., 1996; FAN et al., 1997; KOSKINIEMI et al., 1997 und NIEMEYER et al., 1997). LUK et al. (1997) verwenden das gleiche Prinzip mit dem Unterschied, daß beide Primer für die PCR mit Biotin markiert sind. Bei dieser Art der Immobilisation gelangen mit den PCR Produkten gleichzeitig viele nicht eingebaute, mit Biotin markierte Primer in die Mikrotestplatte. Diese konkurrieren mit den PCR Produkten um die Bindungsstellen. Die Bindungskapazität der mit Streptavidin beschichteten Mikrotestplatten ist laut JONAS et al. (1994) so hoch, daß es nicht nötig ist, das PCR Produkt vor dem Auftragen auf die Mikrotestplatte von den mit Biotin markierten überschüssigen Primern zu reinigen. KOX et al. (1996) sagen aus, daß die Bindungskapazität der mit Streptavidin beschichteten Mikrotestplatte 50fach größer als nötig ist, um die maximale Anzahl des PCR Produktes zu binden. LÜNEBERG et al. (1993) entfernen die nicht inkorporierten Primer über einen Testkit (Geneclean). Auch KOSKINIEMI et al. (1997) reinigen das PCR Produkt für den Sensitivitätsnachweis mit dem Qiaquick- spin PCR purification kit (Quiagen, Hilden). Den Überschuß an freien, nicht inkorporierten mit Biotin markierten Primern und an unverbrauchten Nukleotiden entfernen LUK et al. (1997) durch eine chromatographische Methode (Wizard DNA Clean- up system; Promega, Madison, Wis.). NIEMEYER et al. (1997) setzen die Konzentration der nicht inkorporierten, mit Biotin markierten Primer herab, indem sie das PCR Produkt verdünnen (1: 800).

Ein weiteres, ebenfalls auf der Affinität zwischen Biotin und Streptavidin beruhendes, Prinzip der Immobilisation ist eine mit Biotin markierte DNA- Sonde (Oligonukleotid) zu verwenden. Die Sonde bindet an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotestplatte und das PCR Produkt hybridisiert an die Sonde (KESSLER et al.,1994; LEAR et al., 1995; KANG et al., 1996; PACHNER et al., 1996, PSIKAL et al., 1996 und POGGI POLLINI et al., 1997).

In einigen Fällen ist die Mikrotestplatte an Stelle von Streptavidin, mit Avidin beschichtet (LANDGRAF et al., 1991). Jedoch bindet Avidin im Gegensatz zu Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* (CHAIET und WOLF, 1964) unspezifisch an DNS. Deshalb ist Streptavidin für das Arbeiten mit Nukleinsäuren zu bevorzugen (BUCKLAND, 1986).

Neben der Adsorption und der Ausbildung einer Biotin- Streptavidinbrücke, gibt es eine dritte Möglichkeit, das PCR Produkt an die Mikrotestplatte zu immobilisieren. Dabei wird das PCR Produkt bzw. die Fängersonde durch das Ausbilden einer kovalenten Bindung stabil an die Mikrotestplatte gebunden. RASMUSSEN et al. (1991) beschreiben das Ausbilden einer kovalenten Phosphoramidbindung zwischen einer mit sekundären Aminen beschichteten Mikrotestplatte und Sonden, die an ihrem 5'Ende eine Phosphatgruppe tragen. Nach dem von RASMUSSEN et al. (1991) beschriebenen Verfahren binden LAGE et al. (1996) und CANO et al. (1993) eine Sonde kovalent an eine Mikrotestplatte. Bei CANO et al. (1996) hat die Fängersonde die gleiche Sequenz wie der Vorwärtsprimer in der PCR. Er hybridisiert an der Bindungsstelle des Vorwärtsprimers und kann somit auch unspezifische PCR Produkte an die Mikrotestplatte binden. VEKRIS et al. (1995) beschreiben die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer linearisierten Plasmidsonde und der mit primären Aminen beschichteten Mikrotestplatte.

TANIGUCHI et al. (1994) bilden zwischen dem PCR Produkt und der Mikrotestplatte eine kovalente Bindung in Form einer Peptidbindung aus. Einer der beiden in der PCR eingesetzten Primer ist mit einer primären Aminogruppe markiert und die Oberfläche der Mikrotestplatte trägt freie Carboxylgruppen. Dabei wird zwischen der primären Aminogruppe des PCR Produktes und der Carboxylgruppe der Mikrotestplatte eine Peptidbindung ausgebildet. Um zu verhindern, daß in der PCR nicht eingebaute, mit primären Aminen markierte Primer mit der Mikrotestplatte eine kovalente Bindung ausbilden und damit Bindungsstellen auf der Mikrotestplatte besetzt werden, wird das PCR Produkt mit dem Magic preps PCR purification system (Fa. Promega) gereinigt.

Sonden dienen grundsätzlich als Spezifitätskontrolle, weil sie mit dem PCR Produkt hybridisieren. Die Hybridisierung des PCR Produktes an eine Sonde vermindert den Nachweis unspezifischer PCR Produkte (KESSLER et al., 1994 und LEAR et al., 1995). Unspezifische PCR Produkte sind z. B. Primerdimere oder PCR Produkte, die sich vom nachzuweisenden PCR Produkt durch abweichende Basenpaarlänge oder abweichende Sequenz unterscheiden. Sie hybridisieren nicht an die Sonde und werden aus den Vertiefungen der Mikrotestplatte ausgewaschen. LANDGRAF et al. (1991) markiert den einen PCR-Primer mit Biotin und den anderen Primer für die PCR mit Fluoresceinisothiocyanat. Das PCR Produkt wird über eine Biotin-Streptavidinbrücke an die Mikrotestplatte gebunden und anschließend mit einem gegen Fluoresceinisothiocyanat gerichteten Antikörper nachgewiesen. Unspezifische PCR Produkte wie z. B. Primerdimere können so allerdings aber auch nachgewiesen werden, da eine Spezifitätskontrolle in Form einer Hybridisierung an eine spezifische DNA-Sonde nicht erfolgt.

Auch bei LUK et al. (1997) und bei NIEMEYER et al. (1997) findet keine Hybridisierung einer Sonde an das PCR Produkt statt. Das PCR Produkt wird zum einen durch den Einbau der an Biotin gebundenen Primer markiert, zum anderen wird im Mastermix für die PCR Digoxigenin-dUTP verwendet, dadurch wird zusätzlich Digoxigenin in das PCR Produkt eingebaut. Über eine Biotin-Streptavidinbrücke bindet das PCR Produkt an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotestplatte. Das immobilisierte PCR Produkt wird anschließend mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper nachgewiesen. NIEMEYER et al. (1997) werten mit dem PCR ELISA eine Immuno-PCR aus und können die Primer und das PCR Produkt so auswählen, daß eine Vermehrung von unspezifischen PCR Produkten und Primerdimeren ausgeschlossen werden kann. Die Anzahl der Zyklen für die PCR wird auf 28 festgesetzt, um PCR-Nebenprodukte zu vermeiden. ORTIZ und RITTER (1996) hybridisieren das PCR Produkt ebenfalls nicht mit einer Sonde. Das PCR Produkt wird auch nicht an die Mikrotestplatte immobilisiert. Die PCR wird in den Vertiefungen der Mikrotestplatte durchgeführt. In der PCR Lösung sind, um zu vergleichen, welches System sensitiver ist, entweder Digoxigenin-dUTP oder Biotin-dCTP enthalten, die in das PCR Produkt eingebaut werden. Nach Zusetzen einer DEAE Sephacel-Matrix (Sigma) bindet das höhermolekulare PCR Produkt an die Matrix, die sich an den Boden der Mikrotestplatte absetzt. Die nicht inkorporierten, überschüssigen Nukleotide befinden sich im Überstand, der entfernt wird. Ein für Digoxigenin affiner Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase markiert ist oder mit Alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin binden an das in das PCR Produkt inkorporierte Digoxigenin bzw. Biotin. Die überschüssigen, nicht inkorporierten mit Digoxigenin oder Biotin markierten Nukleotide können nicht an den Antikörper bzw. an das Streptavidin gebunden werden, da sie nicht an die DEAE Sephacel Matrix gebunden werden und mit dem Überstand entfernt werden. ORTIZ und RITTER (1996) stellen fest, daß der Nachweis sensitiver ist, wenn das PCR Produkt mit Digoxigenin markiert ist und mit einem an Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper nachgewiesen wird. Bei einem PCR ELISA ohne Hybridisierungsschritt muß ausgeschlossen sein, daß Primerdimere, PCR Produkte mit abweichender Basenpaarlänge oder Sequenz in der PCR entstehen (ORTIZ und RITTER, 1996).

Generell kann man zwischen Fängersonden und Nachweissonden unterscheiden. Fängersonden sind entweder mit Biotin markiert und binden an eine mit Streptavidin bzw. Avidin beschichtete Mikrottestplatte oder sie tragen eine Phosphatgruppe am 5`Ende und bilden mit einer mit sekundären Aminen beschichteten Mikrottestplatte eine kovalente Phosphoramidbindung aus. Sonden für den Nachweis des PCR Produktes tragen eine Markierung mit der das PCR Produkt nach der Hybridisierung an die Sonde mittels ELISA nachgewiesen werden kann. Sie sind entweder selbst an einen Farbstoff gebunden, der direkt mit einem Lesegerät ausgewertet werden kann oder sie sind an Enzyme für den Substratumsatz gebunden oder als dritte Möglichkeit können Nachweissonden eine Markierung in Form von Biotin, Fluoresceinisothiocyanat, oder Digoxigenin tragen. Eine radioaktive Markierung ist auch möglich, wird aber aus arbeits- und sicherheitstechnischen Gründen vermieden.

Eine Oligonukleotidsonde ist ein kurzkettiges Nukleinsäuremolekül mit einer Kettenlänge von bis zu ca. 20 Nukleotiden. CANO et al. (1993) hybridisieren das PCR Produkt an eine kovalent an die Mikrottestplatte gebundene Oligonukleotidsonde und setzen anschließend eine an das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gebundene Nachweissonde ein.

LAGE et al. (1996) setzen eine kovalent gebundene Oligonukleotidsonde zur Immobilisation ein und hybridisieren zusätzlich eine am 5`Ende mit acht Molekülen Biotin markierte Nachweissonde an das PCR Produkt. Pro Hybridisierungskomplex sind also 8 Markierungen vorhanden, die mit Streptavidin- POD nachgewiesen werden können. Das Verwenden von zwei Sonden erhöht gleichzeitig die Spezifität des Nachweises. LEAR et al. (1995) vergleichen zwei unterschiedliche Methoden miteinander, zum einen hybridisieren sie das PCR Produkt an eine zweite, mit Digoxigenin markierte Oligonukleotidsonde und zum anderen setzen sie PCR Produkte ein, die in der PCR durch Inkorporation von Digoxigenin-dUTP markiert werden.

Eine mit Digoxigenin markierte Oligonukleotidsonde für den Nachweis wird von LÜNEBERG et al. (1993), TANIGUCHI et al. (1994) und von KOX et al. (1996) verwendet. LUNGU et al. (1995) und MARTIN et al. (1995) verwenden eine mit Fluoresceinisothiocyanat markierte Oligonukleotidsonde.

Bei einer Plasmidsonde ist die nachzuweisende DNA gentechnologisch in einen Plasmidvektor eingebaut. Das Plasmid befindet sich in einer Wirtszelle, die einfach vermehrt werden kann. Die zunächst ringförmigen Plasmide werden mit Restriktionsenzymen gespalten und damit linearisiert (GIBELLINI et al., 1993). KELLER et al. (1990) setzen zwei Plasmidsonden ein. Die Fängersonde ist ein Plasmid, das an die Oberfläche der Mikrottestplatte adsorbiert ist und an die eine Hälfte des nachzuweisenden Stranges des PCR Produktes hybridisiert. Die Nachweissonde ist ein Plasmid, das an die andere Hälfte desselben Stranges des PCR Produktes hybridisiert und mit Biotin markiert ist. VEKRIS et al. (1995) setzen eine linearisierte Plasmidsonde ein, die geklonte DNA von *Mycoplasma pneumoniae* enthält.

Die Markierungen dienen als Bindeglieder und vermitteln entweder die Immobilisation des PCR Produktes oder den Nachweis mittels ELISA- Technik. Es werden nicht nur Sonden markiert, sondern das PCR Produkt selbst kann auch mit Biotin oder Digoxigenin markiert werden. Für die Markierung des PCR Produktes gibt es zwei Möglichkeiten: Einmal können mit Biotin oder Digoxigenin markierte Primer verwendet werden, um so die Markierung in das PCR Produkt einzufügen, eine andere Möglichkeit ist, in der PCR Reaktion Digoxigenin-dUTP (LEAR et al., 1995; VEKRIS et al., 1995; KANG et al., 1996; PACHNER et al., 1996; PSIKAL et al., 1996; LUK et al., 1997; POGGI POLLINI et al., 1997 und NIEMEYER et al., 1997) oder Biotin- dCTP (ORTIZ und RITTER, 1996) in das PCR Produkt zu inkorporieren. Digoxigenin- dUTP (Desoxyuridintriphosphat) wird dann ganz oder teilweise an Stelle von dTTP (Desoxythymidintriphosphat) eingebaut, bzw. dCTP (Desoxycytidintriphosphat) wird ganz oder teilweise durch Biotin- dCTP ersetzt.

Die Markierungen der Sonden bzw. des PCR Produktes werden entweder mit an Enzymen gekoppelten Antikörpern oder mit an Enzymen gebundenen Streptavidin nachgewiesen.

Verwendet werden Antikörper mit einer hohen Affinität und Spezifität für Fluoresceinisothiocyanat oder Digoxigenin. Da Digoxigenin z. B. ausschließlich in verschiedenen Arten von *Digitalis* vorkommt, ist die Gefahr der unspezifischen Interaktion mit endogenen zellulären Substanzen oder anderen biologischen Materialien gering (KESSLER et al., 1994). Als Substrate für den Enzymumsatz kommen Fluoreszenzsubstrate, Chemilumineszenzsubstrate oder colorimetrische Substrate in Frage.

TANIGUCHI et al. (1994) und KOX et al. (1996) verwenden einen gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, an den das Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Der Antikörper bindet an die mit Digoxigenin markierte und an das PCR Produkt hybridisierte Sonde. Als Substrat dient das Farbsubstrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin. KANG et al. (1996); PACHNER et al. (1996), PSIKAL et al. (1996) und POGGI POLLINI et al. (1997) weisen das mit Digoxigenin markierte PCR Produkt mit einem gegen Digoxigenin gerichteten und an das Enzym Peroxidase gebundenen Antikörper nach. Als Substrat dient das Farbsubstrat ABTS (2, 2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin 6-sulfonic acid). LANDGRAF et al. (1991) verwenden ebenfalls einen mit POD markierten Antikörper und das Farbsubstrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin. Der Antikörper ist aber gegen das mit Fluoresceinisothiocyanat markierte PCR Produkt gerichtet.

LAGE et al. (1996) weisen eine achtfach mit Biotin markierte, an das PCR Produkt hybridisierte Sonde mit Streptavidin-POD nach. Auch KELLER et al. (1990) weisen die mit Biotin markierte, an das PCR Produkt gebundene Plasmidsonde ebenfalls mit Streptavidin-POD nach. Die an Streptavidin gebundene Peroxidase setzt das Farbsubstrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin um. LEAR et al. (1995), VEKRIS et al. (1995) und LUK et al. (1997) verwenden einen gegen Digoxigenin gerichteten, mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten Antikörper. Als Substrat verwenden sie das Farbsubstrat p-Nitrophenylphosphat.

Den gleichen Enzym-Substratkomplex wie LEAR et al. (1995) benutzen LUNGU et al. (1995), der Antikörper ist aber gegen Fluoresceinisothiocyanat gerichtet und bindet an die damit markierte Sonde. LÜNEBERG et al. (1993) verwenden einen gegen Digoxigenin gerichteten, mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten Antikörper und setzen das Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylphosphat um. CANO et al. (1993) setzen als Substrat für die an die Nachweissonde gebundene Alkalische Phosphatase (AP) das Fluoreszenzsubstrat AttoPhos ein. NIEMEYER et al. (1997) benutzen einen gegen Digoxigenin gerichteten, mit Alkalischer Phosphatase markierten Antikörper und setzen wahlweise das Fluoreszenzsubstrat AttoPhos oder das Farbsubstrat p-Nitrophenylphosphat ein. Der Nachweis mit dem Fluoreszenzsubstrat ist 10fach sensitiver, als der colorimetrische Nachweis. Als Substrat verwenden ORTIZ und RITTER (1996) das Farbsubstrat NBT-BCIP (Nitro blue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat). UREDA et al. (1988) vergleichen einen PCR ELISA mit Sonden, die direkt mit Chemilumineszenzsubstraten oder fluoreszierenden Substraten markiert sind gegenüber Sonden, die mit den Enzymen AP und HRP (horseradish peroxidase) markiert sind und anschließend enzymatisch ein Substrat umsetzen. Mit einbezogen in die vergleichende Untersuchung wird ein PCR ELISA, mit Sonden die mit radioaktivem Phosphor markiert sind. Die Markierung der Sonden mit den Enzymen HRP und AP und anschließendem Substratumsatz ist eindeutig sensitiver, als die direkte Markierung der Sonden mit den Substraten. Am sensitivsten ist der Nachweis bei der radioaktiven Markierung der Sonden. Die Nachweisgrenze für den PCR ELISA mit radioaktivem Phosphor wird nur erreicht bei Einsatz der mit HRP markierten Sonde und anschließendem Umsatz eines Chemilumineszenzsubstrates (Luminol) mit seinem Verstärker (p-hydroxycinnamic acid).

ERHARDT et al. (1996) stellen fest, daß der PCR ELISA mit dem ECL (enhanced chemiluminescence)-Substrat (detection reagent, Johnson & Johnson Clinical Diagnostics)

genauso sensitiv ist, wie die nested PCR und fünfmal sensitiver als der PCR ELISA mit dem colorimetrischen Substrat (ABTS). MARTIN et al. (1995) verwenden einen gegen Fluoreszin gerichteten Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase markiert ist und setzen das Chemilumineszenzsubstrat CSPD® um. Sie quantifizieren die PCR Produkte, indem sie die PCR in ihrer exponentiellen, relativ linearen Phase auswerten, bevor ein Plateau erreicht wird, ab dem eine Erhöhung der Zyklenzahl nicht mehr zu einer starken Vermehrung des PCR Produktes führt. Der von Ihnen entwickelte PCR ELISA ist als PCR Light Chemiluminescent Assay<sup>3</sup> zum Quantifizieren von PCR Produkten kommerziell erhältlich.

## 2.8 Festlegen des Cut- off

Der Cut- off stellt die Grenze zwischen den positiven und den negativen Meßwerten dar. Er wird unterschiedlich definiert. Die Festlegung des Cut- offs hängt von der Höhe der Meßwerte der Negativkontrollen der PCR ab. Schwanken diese stark um ihren Mittelwert, so muß man zur Vermeidung von falsch positiven Werten diese Schwankungen bei der Berechnung des Cut- off berücksichtigen. LÜNEBERG et al. (1993) und LAGE et al. (1996) bestimmen den Cut- off für den PCR ELISA als die auf den Mittelwert der Negativkontrollen der PCR addierte 3fache Standardabweichung (Mittelwert + 3 x  $\sigma$ ). NIEMEYER et al. (1997) berechnen den Cut- off aus dem Mittelwert von drei Ansätzen aus einer Negativkontrolle, auf den die Standardabweichung addiert wird. Einen willkürlich festgesetzten Wert, der deutlich über der auf den Mittelwert der Negativkontrollen der PCR addierten dreifachen Standardabweichung liegt, benutzen KELLER et al. (1990). PACHNER et al. (1996) setzen als Cut- off die auf den Mittelwert addierte dreifache Standardabweichung von vier Negativkontrollen fest.

---

<sup>3</sup> Tropix, Serva, D-Heidelberg, Art. Nr. PC100