

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Anforderungen für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben

Die von BEYER et al. (1995) beschriebene Methode für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ist zu zeit- und arbeitsaufwendig und zu anfällig für Kontaminationen, um in einem diagnostischen Labor als Routinediagnostik angewendet zu werden. Alle Arbeitsschritte müssen in den Ablauf eines Arbeitstages integrierbar sein. Gleichzeitig besteht die Anforderung, mit der verbesserten Methode, wie mit der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode, vier Sporen von *Bacillus anthracis* aus 100 g Erde nachzuweisen. Diese Anforderungen an den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben werden bei der Verbesserung der Methode berücksichtigt.

5.2 Vor- und Nachteile der DNA Gewinnungsmethoden

Grundsätzlich wird die Methode der Anreicherung und des Abtötens von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben von BEYER et al. (1995) übernommen. Um den Anforderungen eines diagnostischen Labors gerecht zu werden, wird sie aber wie folgt verbessert:

Die Erdproben werden im Gegensatz zu der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode direkt in TSB aufgeschwemmt und nicht vorab für 15 Stunden in destilliertem Wasser mit Glaskügelchen geschwenkt und durch ein Sieb gefiltert, weil sich dieser Arbeitsschritt als überflüssig erweist. Er kann aus der Vorschrift entfernt werden, ohne die Sensitivität des Nachweises dadurch herabzusetzen.

Durch die Anzucht der Bodenbakterien in TSB werden die in den Erdproben vorhandenen Hemmstoffe verdünnt und es findet, wenn auch nicht selektiv, eine Vermehrung von *Bacillus anthracis* statt. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß bisher kein flüssiges Selektivnährmedium für die Anreicherung von *Bacillus anthracis* zur Verfügung steht. Um diesen Nachteil auszugleichen, werden bei der verbesserten Methode die in TSB aufgeschwemmten Erdproben für eine halbe Stunde auf 70 °C erhitzt, um eine Vielzahl von hitzelabilen Bakterien (vegetative Formen) abzutöten. Diese konkurrieren anschließend nicht mehr mit *Bacillus anthracis* um die Nährstoffe. Gleichzeitig wird die Spezifität des Nachweises erhöht, da das Risiko für eine falsch positive Reaktion durch einen unbekanntem Bodenkeim vermindert wird. Für *Bacillus anthracis* stellt das Erhitzen darüber hinaus eine Anregung zum Auskeimen dar, so aktivieren MOBERLY et al. (1966) Sporen von *Bacillus anthracis* durch Erhitzen auf 65 °C für 15 Minuten. Für die Beibehaltung der unspezifischen Anzucht von *Bacillus anthracis* in TSB spricht auch, daß die DNA Präparation im Anschluß an die 6 h Kultur erfolgt, in einem Stadium in dem *Bacillus anthracis* noch nicht versport (MARMUR, 1961) ist. Bei der direkten Gewinnung von DNA aus Erdproben ohne unspezifische Voranreicherung muß die DNA aus den Sporen von *Bacillus anthracis* gewonnen werden. Die von BEYER et al. (1995), GLÖCKNER (1996) und MISTELE (1992) beschriebene Methode, die Reste des Wasserstoffperoxids mit Tris HCl (pH 7,2) auszuwaschen, ist sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig und stellt einen weiteren Nachteil der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben dar. Im Gegensatz dazu ist der Abbau des Wasserstoffperoxids durch das Enzym Katalase vom Arbeitsaufwand weniger umständlich und führt zu einer Zeitersparnis von ca. 1,5 Stunden. Der größte Vorteil der verbesserten Methode ist, daß die 6 h Kultur, das Abtöten und das Entfernen der Wasserstoffperoxidreste innerhalb der regulären Arbeitszeit eines

Arbeitstages zu bewältigen sind, was mit der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode nicht möglich war.

Alle bisher beschriebenen Methoden zur Isolierung von DNA aus *Bacillus anthracis* sind zu zeitaufwendig und zu umständlich, um von einem diagnostischen Routinelabor angewendet werden zu können. Die von GLÖCKNER (1995) empfohlene DNA Präparation nach MISTELE (1992), die von BEYER (pers. Mitteilung) modifiziert wurde dauert über 5,5 h. Sie ist darüber hinaus sehr arbeitsintensiv und besteht aus vielen Einzelschritten, in denen die Gefahr für eine Kontamination der DNA- Lösung besteht. Bei der Gewinnung von DNA aus *Bacillus anthracis* mit dem EASY DNA™ Kit wird eine große Menge DNA von guter Qualität innerhalb von 1,5 h präpariert. Sowohl bei der Präparation von DNA mit dem EASY DNA™ Kit als auch mit der Vorschrift 1 für die Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit, können vier Sporen von *Bacillus anthracis* in 100 g Erde mit dem PCR ELISA nachgewiesen werden. Die DNA Isolierung mit der Vorschrift 1 für die Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit ist ebenfalls zeitsparender und weniger aufwendig als alle Methoden, die bisher für die Gewinnung von DNA aus *Bacillus anthracis* beschrieben werden. Ein Nachteil des Puregene DNA Isolation Kit im Vergleich zum EASY DNA™ Kit ist zum einen die längere Dauer der DNA Isolierung (2,5 h) und daß die DNA Ausbeute nur halb so groß ist. Eine vergleichbare DNA Ausbeute wie mit dem EASY DNA™ Kit wird bei der Gewinnung von DNA aus Reinkulturen von *Bacillus anthracis* mit der Vorschrift 2 zur Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit erreicht. Bei der Gewinnung von DNA mit dem Puregene DNA Isolation Kit aus proteinreichen Pellets treten bei der Vorschrift 2 allerdings sehr große Schwierigkeiten beim Lösen der DNA in TE- Puffer auf. Diese führen dazu, daß das DNA Pellet sich teilweise überhaupt nicht löst und die Vorschrift 2 zur Isolierung von DNA aus bestimmten Erdproben ungeeignet ist. Bei der Vorschrift 3 zur Durchführung des Puregene DNA Isolation Kit soll durch die beinahe vollständige Entfernung der Zellwand (Sphäroplastengeneration) die anschließende Lyse der Zellen erleichtert werden, was in dieser Arbeit nicht zu einer Verbesserung der DNA Ausbeute führt. Die Gewinnung von DNA aus dem vollständigen Pellet der 6 h Kultur mit dem Dynal Dynabeads DNA Direct™ Kit gelingt nicht. Weil nur ein Teil der Zellen des Pellets lysiert werden, ist die Lösung so dick, daß sich die magnetischen Partikel nicht an den Magneten absetzen. Aufgrund der hohen Ausbeute, der kurzen Präparationsdauer und der guten Qualität der DNA ist der EASY DNA™ Kit ideal für die Gewinnung von DNA für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

5.3 Diskussion der optimalen Bedingungen für die PCR für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit dem PCR ELISA

Für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit dem PCR ELISA werden folgende Ansprüche an die PCR gestellt: Das PCR Produkt wird während der PCR markiert, die Kosten für die PCR werden so gering wie möglich gehalten, die Sensitivität des Nachweises wird durch die Art der Durchführung der PCR gesteigert, eine Kontamination der PCR wird vermieden und die Hemmstoffe für die PCR werden entfernt. Inwieweit die in dieser Untersuchung ermittelten Ergebnisse diesen Ansprüchen gerecht werden, wird im folgenden diskutiert. Im Unterschied zu der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit der nested PCR wird für den PCR ELISA Digoxigenin- 11- dUTP während der PCR in das PCR Produkt eingebaut. Digoxigenin- 11- dUTP behindert die Taq Polymerase partiell (VEKRIS et al., 1995). Deshalb erleichtern VEKRIS et al. (1995) den Einbau von Digoxigenin- 11- dUTP dadurch, daß sie die Phase der Extension auf 3 Minuten verlängern. Eine Verlängerung der Extensionsphase auf 3 Minuten führt dazu, daß die DNA Präparation mit dem EASY DNA™

Kit und die PCR nicht innerhalb der regulären Arbeitszeit eines Arbeitstages erledigt werden können, weil die PCR dann zu lange dauert. Eine Alternative zu der Verlängerung der Extensionsphase auf drei Minuten stellt das Einfügen eines Zeitincrementsegmentes dar. Für die Vermehrung der großen PCR-Fragmente bei den PCR-Fingerprint-Techniken wird ein Zeitincrementsegment in der Extensionsphase eingefügt. Der Polymerase wird pro Zyklus jeweils zusätzlich eine bestimmte verlängerte Reaktionszeit gewährt, um Ermüdungserscheinungen des Enzyms auszugleichen. Diese entstehen durch das regelmäßige Erhitzen auf über 90 °C während der Phase der Denaturation (BEYER, pers. Mitteilung). Durch das Einfügen des Zeitincrementsegmentes wird der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP erleichtert, gleichzeitig sind die DNA-Präparation und die anschließende PCR innerhalb eines Arbeitstages durchführbar. Der Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit dem PCR-ELISA soll möglichst kostengünstig und sensitiv sein. Diese Anforderungen werden durch die Änderung der Bedingungen für die Durchführung der PCR erreicht:

Die Durchführung der PCR im Volumen von 50 µl führt zu einer Kostensenkung durch Einsparung des PCR-Dig-Lab-Mix. Digoxigenin-11-dUTP stört die PCR erheblich. Durch eine Erhöhung der MgCl₂-Konzentration auf 2,5 mM wird vermehrt Digoxigenin-11-dUTP in das PCR-Produkt eingebaut und die Sensitivität des PCR-ELISA erhöht.

Eine Erhöhung der MgCl₂-Konzentration oder die Durchführung der PCR im Volumen von 50 µl haben aber den Nachteil, daß es bei der PCR eher zum Ausbilden von Fehlbanden kommt, die ein falsch positives Ergebnis vortäuschen können. Dies gilt insbesondere für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben, weil deren Zusammensetzung aus mikrobiologischer Sicht weitgehend unerforscht ist. Um die Bedingungen für die PCR so stringent wie möglich zu halten, wird auf eine Reduzierung des Reaktionsvolumens für die PCR und auf eine Erhöhung der Konzentration des freien Magnesiums im Prämix der PCR verzichtet. Beim Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit der sehr sensitiven nested PCR ist das Risiko für ein falsch positives Ergebnis durch eine carry-over-Kontamination sehr hoch. Die Kontaminationsgefahr für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit dem PCR-ELISA ist deutlich geringer. Das Enzym Uracil-DNA-Glykosylase baut carry-over-Kontaminationen, die im Prämix der PCR enthalten sind, vor Ablauf der PCR-Zyklen ab. Inwieweit die Ursachen für den wenig effektiven Abbau der carry-over-Kontaminationen in dieser Untersuchung von dem Versuchsaufbau abhängen, soll nachstehend diskutiert werden:

Die in dieser Arbeit verwendete Reaktionstemperatur für die Uracil-DNA-Glykosylase beträgt 37 °C. KOX et al. (1994) und KANG et al. (1996) verwenden 50 °C als Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit ist sehr viel kürzer als in dieser Arbeit und es wird eine geringere Menge des Enzyms pro Versuchsansatz verwendet. Die für diese Untersuchung verwendete Temperatur und Dauer der Einwirkung der Uracil-DNA-Glykosylase, die Inaktivierungsdauer und -temperatur sowie die Einheiten des Enzyms, die pro PCR-Ansatz verwendet werden, richten sich genau nach den Herstellerangaben. NOORDHOEK et al. (1995) inkubieren die PCR-Ansätze vor Ablauf der Zyklen ebenfalls bei 37 °C mit der Uracil-DNA-Glykosylase. Die Uracil-DNA-Glykosylase ist ein Enzym, daß unter natürlichen Verhältnissen im lebenden Organismus vorkommt und bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C arbeitet, so daß davon auszugehen ist, daß das Reaktionsoptimum für das Enzym bei 37 °C liegt. Eine weitere Möglichkeit, den Abbau der carry-over-Kontaminationen durch die Uracil-DNA-Glykosylase zu verbessern besteht darin, dTTP komplett durch dUTP im Prämix zu ersetzen. Bei längeren PCR-Produkten wird dadurch aber die Sensitivität beeinträchtigt (LONGO et al., 1990). Um die Sensitivitätsverluste auszugleichen, wird in der Produktinformation zur Uracil-DNA-Glykosylase empfohlen, die Konzentration von MgCl₂ von 1,5 mM auf 2,5 mM zu erhöhen. KOX et al. (1994) ersetzen dTTP vollständig durch dUTP bei einer MgCl₂-Konzentration von 2 mM und KESSLER et al. (1997) benutzen im

Prämix für die PCR eine 3 mM MgCl₂- Lösung. Bei zu viel freiem Magnesium in der PCR kommt es aber zu unerwünschten Amplifikationen (WILLIAMS, 1989). Um die Akzeptanz der DNA Polymerase für Uridintriphosphat zu erhöhen verwenden KANG et al. (1996) die dreifache Menge dUTP. Da Digoxigenin- 11- dUTP eine kostspielige Substanz ist und 5 % des dTTP für die Markierung der PCR Produkte durch Digoxigenin- 11- dUTP ersetzt werden, würden die Kosten für die PCR erheblich steigen.

Der Einsatz des Enzyms Uracil- DNA Glykosylase lohnt sich nicht, weil eine Änderung der Bedingungen für die PCR für einen optimalen Einsatz des Enzyms zu einem Sensitivitätsverlust, zu einer erheblichen Kostensteigerung und zu einem erhöhten Risiko für falsch positive Ergebnisse, führt. Der Einsatz der Uracil- DNA Glykosylase ist unter den hier gegebenen Bedingungen uneffektiv zur Vermeidung von carry- over Kontaminationen beim Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben.

Beim Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben können die in den Bodenproben enthaltenen Hemmstoffe, z. B. Huminsäuren, die PCR behindern und den Nachweis von *Bacillus anthracis* unmöglich machen. MACK et al. (1996) setzen den QUIAquick Spin PCR Purification Kit zur Reinigung von PCR Produkten ein, er eignet sich aber auch für die Reinigung von DNA- Lösungen. Der DNA Verlust durch die Reinigung mit dem QUIAquick Spin PCR Purification Kit, der mittels UV- Absorption ermittelt wird, ist bedeutend größer, als der DNA Verlust, der sich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA- Lösung darstellt. Vor der Reinigung werden mit der UV- Absorption neben der DNA auch andere Substanzen, die Licht bei 260 nm Wellenlänge absorbieren, z. B. RNA und Oligonukleotide gemessen, so daß eine größere DNA Konzentration vorgetäuscht wird. Durch die Reinigung mit dem QUIAquick Spin PCR Purification Kit werden diese Substanzen entfernt, so daß der DNA- Verlust höher erscheint, als er tatsächlich ist. Die Diskrepanz zwischen den Konzentrationsverlusten, die mittels UV- Absorption und mit der Agarosegelelektrophorese ermittelt werden, entsteht dadurch, daß diese Substanzen mit der Agarosegelelektrophorese nicht dargestellt werden.

5.4 Vor- und Nachteile des PCR ELISA gegenüber der nested PCR

Für eine diagnostisches Routinelabor ist der PCR ELISA leichter zu handhaben als die nested PCR, für die ein großer Aufwand betrieben werden muß (KWOK et HIGUCHI, 1989), da sie sehr anfällig für Kontaminationen ist. Ein weiterer Nachteil ist, daß für die Auswertung der nested PCR eine gelelektrophoretische Apparatur nötig ist. Der Vorteil der nested PCR gegenüber dem PCR ELISA ist, daß die nested PCR sensitiver ist. Trotz ihrer hohen Sensitivität ist die nested PCR aufgrund ihrer erheblichen Nachteile für ein diagnostisches Labor ungeeignet. Die ELISA Technik ist eine anerkannte und übliche Technik in der Routinediagnostik. Obwohl der PCR ELISA weniger sensitiv ist, als die nested PCR ist er aufgrund folgender Vorteile besser für ein diagnostisches Labor geeignet: Der PCR ELISA ist kaum anfällig für Kontaminationen. Er ist automatisierbar und kann einfach mit einem Lesegerät ausgewertet werden. Ein Beispiel für die praktische Anwendung des PCR ELISA ist der kommerzielle HIV- Test, den die Fa. La Roche im Format des PCR ELISA anbietet.

5.5 Grundsätzliche Anforderungen an den PCR ELISA für einen möglichst sensitiven Nachweis von *Bacillus anthracis*

Der für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben geeignete PCR ELISA sollte möglichst sensitiv sein und eine Spezifitätskontrolle enthalten. Aus den zahlreichen in der Literatur beschriebenen unterschiedlich aufgebauten PCR ELISA wird ein PCR ELISA ausgewählt, dessen prinzipieller Aufbau einen sehr sensitiven Nachweis ermöglicht. Es wird eine große Menge des PCR Produktes (60 µl) im PCR ELISA eingesetzt. Jeder Strang des PCR Produktes wird während der PCR mehrfach markiert. Beide Stränge des PCR Produktes werden nachgewiesen und es findet ein enzymatischer Substratumsatz statt.

Als Spezifitätskontrolle für den Nachweis dienen die Fängersonden. Die Einzelstränge des PCR Produktes werden nur an die Mikrottestplatte immobilisiert, wenn sie an die für das gesuchte DNA- Fragment spezifischen Sonden hybridisieren. Die hier verwendeten Sonden dienen gleichzeitig als innere Primer für die nested PCR (BEYER et al., 1995). In keinem einzigen Fall ist der PCR ELISA positiv und die stets gleichzeitig durchgeführte nested PCR negativ. Die Spezifität des PCR ELISA entspricht der Spezifität der nested PCR. PATRA et al. (1996) beschreiben den chromosomalen Nachweis von *Bacillus anthracis* mit den Sonden C1 und D3 mittels PCR ELISA. Beide Sonden binden an den gleichen Strang des PCR Produktes. Um beide Stränge des PCR Produktes nachzuweisen, wird an Stelle von D3 das antiparallele Oligonukleotid 3D benutzt. Die für den PCR ELISA verwendeten Sonden sind Oligonukleotidsonden, die spezifischer an das PCR Produkt hybridisieren, als größere Sonden (MIFFLIN, 1989). Verwendet man größere Sonden, so ist das Risiko, daß diese partiell an ein heterologes PCR Produkte hybridisieren, größer, da eine streckenweise Übereinstimmung mit einer von der Ziel- DNA abweichenden Sequenz möglich ist. Der Aufbau des PCR ELISA wird so gewählt, daß ein möglichst sensitiver Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben gewährleistet ist, er ist nicht geeignet für eine quantitative Auswertung. Deshalb streuen die gemessenen Werte etwas um die zugehörige DNA- Verdünnungsstufe und ausgehend vom gemessenen Wert können auch keine Rückschlüsse auf die Menge der Milzbrandbazillen in den Erdproben geschlossen werden. Da die Plasmide mehrfach in einem Bakterium vorkommen ist die Voraussetzung für einen quantitativen Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben anhand des Nachweises der Plasmide nicht gegeben. Ein quantitativer Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben wäre nur sinnvoll für den Nachweis des Chromosoms, das bisher nicht spezifisch aus Erdproben nachgewiesen werden kann. MARTIN et al. (1995) beschreiben die Anforderungen an den Aufbau eines quantitativen PCR ELISA. Um mit einem PCR ELISA zu quantifizieren wird nur ein Strang des PCR Produktes nachgewiesen. Die Stränge des PCR Produktes müssen die gleiche Anzahl von Markierungen aufweisen. Die Anzahl der PCR Zyklen wird so gewählt, daß noch eine annähernd lineare Vermehrung des PCR Produktes stattfindet, da mit steigender Zyklenzahl sich die Anzahl der gebildeten PCR Produkte einem Plateau annähert. Dieser Aufbau ermöglicht die Zuordnung der gemessenen Werte zu der eingesetzten DNA Konzentration, er ist aber weniger geeignet für einen möglichst sensitiven Nachweis.

5.6 Diskussion der Ergebnisse des Nachweises von *Bacillus anthracis* mit dem PCR ELISA

Der PCR ELISA für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben kann wahlweise mit einem Chemilumineszenz- einem Fluoreszenzsubstrat oder mit einem Farbsubstrat ausgewertet werden. UREDA et al. (1988) und ERHARDT et al. (1996) stellen fest, daß der

PCR ELISA mit einem Chemilumineszenzsubstrat sensitiver ist, als der PCR ELISA mit einem Farbsubstrat. Der Nachweis mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD (mit Enhancer, Sapphire II) ist nach den Aussagen von MARTIN et al. (1995) sehr sensitiv. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von UREDA et al. (1988) und ERHARDT et al. (1996) ist der Nachweis mit dem Chemilumineszenzsubstrat in dieser Arbeit nicht sensitiver, als der colorimetrische Nachweis. NIEMEYER et al. (1997) gelangen zu dem Ergebnis, daß der PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat AttoPhos zehnmal sensitiver ist, als der Nachweis mit dem Farbsubstrat p- Nitrophenylphosphat. Wie bei NIEMEYER et al. (1997) ist der Nachweis des Plasmids pXO1 mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat zehnmal sensitiver, als der colorimetrische Nachweis. Warum die Sensitivität des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat für den Nachweis des Chromosoms und des Plasmids pXO2 nicht größer ist, als beim colorimetrischen Nachweis mit dem PCR Dig Detection Kit, wird im folgenden diskutiert: Mit dem PCR Dig Detection Kit können 10 fg DNA für den Nachweis des Plasmids pXO1 gerade nicht mehr nachgewiesen werden, die Steigerung der Sensitivität beim Nachweis mit dem Fluoreszenzsubstrat reicht aus für den Nachweis von 10 fg DNA. Für den Nachweis des Plasmids pXO2 und des Chromosoms führt die Steigerung der Sensitivität nicht zu einem meßbaren Unterschreiten der Nachweisgrenze. Da die zur Festlegung der Nachweisgrenze verwendete DNA- Verdünnungsreihe 1 : 10 hergestellt ist, können nur Steigerungen der Sensitivität um den Faktor 10 erkannt werden. Eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 wird nur für den Nachweis des Plasmids pXO1 erreicht.

Werden 40 µl an Stelle von 60 µl des PCR Produktes für den PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat eingesetzt, sind 10 fg DNA von *Bacillus anthracis* nicht immer nachweisbar. Beim direkten Vergleich des PCR Dig Detection Kit mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat, beträgt die Nachweisgrenze für das Plasmid pXO1 mit beiden PCR ELISA 100 fg (s. Pkt. 4.6, Tab. 24). Für den direkten Vergleich werden aus demselben PCR Ansatz im Volumen von 100 µl je 40 µl für jeden der beiden PCR ELISA entnommen. Die Vorschrift 1 zur Durchführung des PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat ist besser als die Vorschrift 2, weil das unspezifische Binden der Antikörper an das Polystyrol der Mikrotestplatte dadurch verhindert wird, daß die unspezifischen Bindungsstellen mit Casein abgedeckt werden. Dadurch sind die Untergrundwerte (Negativwerte) bei der Durchführung der Vorschrift 1 niedriger.

Bei der Auswahl der Substratlösung für den PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat werden aus praktischen Gründen 1 mg pro 100 ml Substratpuffer eingewogen. Der Substratpuffer nach LÜNEBERG et al. (1993) ist ungeeignet, weil das Methylumbelliferylphosphat in der Lösung übersättigt ist und ausfällt. Für die Herstellung von 100 ml der Substratlösung nach TADA et al. (1992) werden so geringe Mengen Methylumbelliferylphosphat benötigt, die technisch nur sehr schwer abzuwiegen sind. Dadurch wird es sehr schwer, stets eine Substratlösung gleichbleibender Qualität herzustellen.

Die Nachweisgrenze der nested PCR liegt nach GLÖCKNER (1996) für das Plasmid pXO2 bei 10 fg und für das Plasmid pXO1 bei 1 fg, wobei die Bande auf dem Gel bei Detektion von 1 fg DNA für den Nachweis des Plasmids pXO1 gerade eben sichtbar ist. Die bisher bekannte chromosomale Sequenz von Ba 813 ist zu kurz (152 bp), um darin innere Primer für eine nested PCR zu finden (PATRA et al., 1995). Die Nachweisgrenze der PCR für den Nachweis des Chromosoms liegt nach 30 oder nach 35 PCR Zyklen bei 100 pg. Für den Nachweis des Plasmids pXO1 wird die größte Sensitivität mit dem PCR ELISA mit dem Fluoreszenzsubstrat, bei Erweiterung des PCR ELISA mit dem Testkit AmpliQ und bei Erhöhung der MgCl₂- Konzentration im Prämix der PCR erreicht. Die Sensitivität des PCR ELISA ist dabei um den Faktor 10 geringer, als die Sensitivität der nested PCR. Beim Nachweis des Plasmids pXO2 wird die gleiche Sensitivität wie bei der nested PCR erreicht, wenn der PCR ELISA mit dem Testkit AmpliQ erweitert wird oder wenn die MgCl₂- Konzentration im Prämix der PCR erhöht wird. Für den chromosomalen Nachweis, der nicht

mit einer nested PCR geführt werden kann, stellt der PCR ELISA eine Steigerung der Nachweisgrenze um den Faktor 100 dar.

Beim PCR ELISA, der mit dem Testkit AmpliQ erweitert wird ist eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 im Vergleich zum PCR Detection Kit nur möglich für die Nachweise der Plasmide pXO1 und pXO2. Die Sensitivitätssteigerung, die durch den Einsatz des Testkit AmpliQ erreicht wird, genügt nicht, um die Sensitivität für den Nachweis des Chromosoms um den Faktor 10 zu steigern. Der Nachweis von vier Sporen aus 100 g Erde gelingt bereits mit dem colorimetrischen Nachweis, sowohl mit dem PCR Dig Detection Kit als auch mit dem PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden. Deshalb kommen grundsätzlich alle in dieser Untersuchung beschriebenen Vorschriften zur Durchführung eines PCR ELISA für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben in Frage. Eine Ausnahme stellen die Vorschriften 2 und 3 zur Durchführung des PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden dar, da die Sensitivität dieser PCR ELISA geringer ist, als die Sensitivität des PCR Dig Detection Kit. Da die Reaktionspuffer des PCR Dig Detection Kit auch einzeln von der Fa. Boehringer zu beziehen sind, ist es nicht unbedingt erforderlich den PCR ELISA mit kovalent gebundenen Sonden mit den modifizierten Reaktionslösungen nach LAGE et al. (1996) durchzuführen.

Beim Vergleich der Ergebnisse der nested PCR mit den Ergebnissen des PCR Dig Detection Kit für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ist der PCR ELISA in keinem Fall positiv, wenn die nested PCR negativ ist. Beide Nachweisverfahren unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Spezifität des Nachweises von *Bacillus anthracis* aus Erdproben. Durch die geringere Sensitivität des PCR Dig Detection Kit, ist das Ergebnis der nested PCR bei einigen Erdproben mit der nested PCR positiv und mit dem PCR ELISA negativ. Da der Nachweis für das Chromosoms und das Plasmids pXO2 aus Bodenproben nicht spezifisch ist, sind nicht alle Erdproben grundsätzlich positiv.

Um den Zeitaufwand des PCR ELISA zu begrenzen wird die Hybridisierungsdauer von drei Stunden auf anderthalb Stunden gekürzt. Durch eine Kürzung der Hybridisierungsdauer auf anderthalb Stunden beträgt die Gesamtdauer für den PCR ELISA ca. drei Stunden. Für den Ablauf in einem diagnostische Routinelabor ist es nicht erforderlich, die Gesamtdauer des PCR ELISA weiter zu kürzen. Um nicht unnötig einen Sensitivitätsverlust zu riskieren, wird die Hybridisierungsdauer nicht auf eine Stunde gekürzt, obwohl dies nach den Ergebnissen dieser Untersuchung möglich ist. Der in dieser Arbeit entwickelte PCR ELISA für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben ist sehr vielseitig. Er kann sowohl mit einem Fluoreszenzmeßgerät, einem Chemilumineszenzmeßgerät, als auch colorimetrisch mit einem ELISA Reader ausgewertet werden. Durch den Testkit AmpliQ kann die Nachweisgrenze des PCR ELISA an die Nachweisgrenze der nested PCR angenähert werden. Der PCR ELISA kann sowohl mit kovalent an die Mikrottestplatte gebundenen Sonden, als auch über eine Bindung der Sonden über eine Streptavidin Biotin Brücke durchgeführt werden. Er ist vom Zeit- und Arbeitsaufwand gut geeignet für die Durchführung in einem diagnostischen Routinelabor.

5.7 Überprüfung der Spezifität der Primer und Sonden, die für den Nachweis von *Bacillus anthracis* verwendet werden

PATRA et al. (1996) haben die Primer und Sonden für den Nachweis des Chromosoms von *Bacillus anthracis* mit vielen Bakterienstämmen, darunter auch Bakterienstämme mit einem hohen Verwandtschaftsgrad zu *Bacillus anthracis*, getestet. Die von PATRA et al. (1996) ermittelte 100 %ige Spezifität kann durch diese Untersuchung nicht bestätigt werden. Es werden drei Stämme von *Bacillus cereus* entdeckt, die in der PCR für den Nachweis des Chromosoms positiv reagieren. Zwei der Stämme wachsen auf dem Selektivnährboden für die

Anzucht von *Bacillus anthracis*, PLET Medium (KNISELY et al., 1966), das auch nach den Ergebnissen dieser Untersuchung nicht 100 %ig spezifisch ist. Die Isolierung von Bakterien, die zu einem falsch positiven Ergebnis für den Nachweis des Plasmids pXO2 führen, ist schwierig, weil sie vermutlich in einer sehr geringen Anzahl im Erdboden vorkommen. Diese Bakterien führen zu einem positiven Ergebnis der nested PCR, sie sind mit der ersten PCR nicht nachzuweisen. Daß ein sensitives Verfahren wie die nested PCR nötig ist, um zu einem falsch positiven Ergebnis zu gelangen, spricht möglicherweise dafür, daß das Vorkommen dieser Bakterien im Erdboden gering ist. Eine Kontamination als Ursache für die falsch positiven Ergebnisse beim Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus den Erdproben E2, E3 und E4 kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da in den Produkten der nested PCR Spaltorte für Restriktionsendonukleasen nicht enthalten sind, die in der von MAKINO et al. (1989) veröffentlichten Sequenz des Plasmids pXO2 vorkommen. Obwohl *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* kapselähnliche Substanzen exprimieren, kommen MAKINO et al. (1989) zu dem Ergebnis, daß die cap Region auf genetischer Ebene hochspezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* ist. Die Produkte der nested PCR aller regelmäßig im Labor verwendeten Stämme von *Bacillus anthracis* werden durch die Restriktionsendonukleasen gespalten (Ergebnisse nicht dargestellt) und die Sequenz des Produktes der nested PCR des Stammes A42 stimmt mit der von MAKINO et al. (1989) ermittelten Sequenz überein, was dafür spricht, daß die cap-Region aller Stämme von *Bacillus anthracis* hochkonserviert ist. Die von MAKINO et al. (1989) gewonnenen Ergebnisse werden zusätzlich dadurch gestützt, daß die PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern mit Stämmen von *Bacillus licheniformis* negativ ist. GLÖCKNER (1996) überprüft die Spezifität der PCR mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern für den Nachweis des Plasmids pXO2 mit Stämmen von *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* und kommt zu dem Ergebnis, daß die PCR spezifisch ist.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Produkte der nested PCR beweisen das Vorkommen eines Stammes in der Erde, der eine im Bereich der Kapselgene ähnliche Sequenz wie das Plasmid pXO2 von *Bacillus anthracis* besitzt. Die Unterschiede in der Abfolge der Basen folgen einem System und sind nicht zufällig. Im Vergleich zu der Sequenz von *Bacillus anthracis* treten in der Sequenz des unbekanntes Stammes sehr viele Punktmutationen auf, die fast alle die dritte Base eines Triplets betreffen. Als sogenannte stille Punktmutationen führen sie nicht zum Austausch einer Aminosäure. Alle Primer, die in der Literatur für den Nachweis des Plasmids pXO2 beschrieben werden (MAKINO et al., 1993; REIF et al., 1994; BEYER et al., 1995; SJÖSTEDT et al., 1995; RAMISSE et al., 1996; SJÖSTEDT et al., 1997), werden mit denselben DNA- Lösungen auf ihre Spezifität getestet, die für die Herstellung der sequenzierten PCR Produkte verwendet werden. Die DNA Lösungen der Erdproben E2, E3, E4 und des Salmonellenstammes LT2 werden nicht für jede PCR neu hergestellt, um sicherzugehen, daß diese DNA- Lösungen keine cross over Kontaminationen enthalten. Die Primer dieser Autoren werden nicht routinemäßig im Labor eingesetzt und werden extra für dieses Experiment bestellt, so daß ein massenhaftes Auftreten dieser PCR Produkte im Labor ausgeschlossen werden kann. Da dieselben DNA- Lösungen mehrfach für mehrere Primer positiv sind, müßten carry- over Kontaminationen mit mehreren PCR Produkten vorliegen (außer mit den sequenzierten PCR- Produkten). Die Kontrollen der PCR sind selbstverständlich negativ. Für die von MAKINO et al. (1993) beschriebene PCR für den Nachweis der DNA des Plasmids pXO2 existieren keine inneren Primer, daher ist die Sensitivität des Nachweises geringer, als bei der Durchführung einer nested PCR. Die PCR mit der DNA- Lösung, die aus der Erdprobe E2 stammt, ist dennoch positiv. Die Sensitivität der von REIF et al. (1994) beschriebenen PCR mit Primern BACA6RI und BACA1FI reicht nicht aus, um den unbekanntes Stamm aus Erdproben nachzuweisen. Deshalb wird eine seminested PCR mit dem von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primer Cap9 durchgeführt.

Das positive Ergebnis der seminested PCR beweist, daß eine Vermehrung der DNA des unbekanntes Stammes mit den von REIF et al. (1994) beschriebenen Primern stattfindet. Die seminested PCR mit den von REIF et al. (1994) beschriebenen Primern als äußeren Primern ist zusätzlich positiv für den Salmonellenstamm LT2 (Wiederholungen nicht dargestellt) und ist damit nicht spezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis*.

Alle Primer, die in der Literatur für den Nachweis des Plasmids pXO2 beschrieben werden (MAKINO et al., 1993; REIF et al., 1994; BEYER et al., 1995; SJÖSTEDT et al., 1995; RAMISSE et al., 1996; SJÖSTEDT et al., 1997), sind unspezifisch für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Erdproben.

Die DNA-Lösung, die für die Herstellung des sequenzierten Produktes der nested PCR verwendet wird, enthält die DNA eines Bakteriums, das zu einem falsch positiven Nachweis des Plasmids pXO2 führt. Die Spezifität der in der Literatur beschriebenen PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2 wird mit vielen Bakterienstämmen, darunter auch Bakterienstämme mit einem hohen Verwandtschaftsgrad zu *Bacillus anthracis*, getestet. Da die mikrobiologische Zusammensetzung der Bodenproben weitgehend unerforscht ist und in den Bodenproben Stämme enthalten sind, die einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *Bacillus anthracis* aufweisen, reicht es nicht aus, die Spezifität der PCR mit den in den Stammsammlung vorhandenen Stämmen zu testen. Es ist sehr wichtig, die Spezifität der PCR zusätzlich anhand von negativen Erdproben zu überprüfen.

BEYER et al. (1995) untersuchen eine große Anzahl von Erdproben auf das Vorhandensein von *Bacillus anthracis* mit der nested PCR für den Nachweis des Plasmids pXO2. Sie verwenden als Negativkontrolle eine Erdprobe von einem Standort, der für das Vorkommen von *Bacillus anthracis* unbedenklich ist. Reagiert diese Erdprobe positiv, so führen BEYER et al. (1995) dieses Ergebnis fälschlicherweise auf eine Kontamination zurück. Als Verbesserung der von BEYER et al. (1995) beschriebenen Methode wird in dieser Arbeit als Negativkontrolle für die Anzucht und die DNA-Präparation ein beliebiger Bakterienstamm (hier z. B. der Salmonellenstamm LT2) und nicht eine Erdprobe mit unbekannter mikrobiologischer Zusammensetzung verwendet.

Nach der Einführung von sehr strengen Arbeitsbedingungen, durch die eine Kontamination der Proben vermieden wird, liegen in dieser Untersuchung keine Hinweise dafür vor, daß der Nachweis des Plasmids pXO1 mit den von BEYER et al. (1995) beschriebenen Primern unspezifisch ist. *Bacillus anthracis* kann zur Zeit nur dann aus Bodenproben nachgewiesen werden, wenn es sich um Stämme handelt, die das Plasmid pXO1 enthalten.

5.8 Suche nach Primern, die spezifisch sind für den Nachweis des Chromosom und des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben

Außer der Sequenz von Ba813 (PATRA et al., 1996) ist eine weitere chromosomale Sequenz von *Bacillus anthracis* bekannt, die von ETIENNE-TOUMELIN et al. (1994) beschriebene Sequenz des Sap-Gens (surface array protein). ETIENNE-TOUMELIN et al. (1994) beschreiben, daß die N-terminale Region des Sap eine ähnliche Sequenz besitzt wie das Oberflächenstrukturprotein von *Acetogenium kivui*, das Mittelwandprotein von *Bacillus brevis*, das Omp α Protein von *Thermotoga maritima* und das Oberflächenstrukturprotein des mit *Bacillus anthracis* eng verwandten *Bacillus thuringiensis*. Der spezifische Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben mit der PCR mit den Primern SAP3V und SAP3R, die aus der Sequenz des Sap ausgewählt werden, ist nicht möglich, da es zu falsch positiven Ergebnissen aus negativen Erdproben kommt. Dieses Gen ist für den Nachweis von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben nicht geeignet, da es in ähnlicher Form (sequenzabhängig) auch in anderen Bodenbakterien vorkommt.

Aus dem Genabschnitt B des Plasmids pXO2 wird der Primer Cap10 ausgesucht, der am 3'Ende die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamH I beinhaltet. Aus dem Genabschnitt C des Plasmids pXO2 wird der Primer Cap20rev ausgesucht. Die Sequenz des Primers Cap20rev unterscheidet sich an 4 Stellen von der Sequenz, die aus dem Produkt der nested PCR der Erdproben ermittelt wird. Die Unterschiede befinden sich in der Nähe des 3'Endes, wobei die Base am 3' Ende ebenfalls betroffen ist. Die Temperatur für das Annealing wird sehr hoch gewählt, um ein Anlagern der Primer an eine abweichende Sequenz (Mispriming) zu verhindern und die Spezifität der PCR zu erhöhen. Obwohl für die nested bzw. seminested PCR die gleiche DNA- Lösung benutzt wird, wie für die Herstellung des Produktes der nested PCR, das sequenziert wurde, bleibt die nested PCR bzw. die seminested PCR positiv. Dabei ist die Erdprobe E2 in der seminested PCR mit den Primern 17 und Cap20rev negativ, nur die Erdproben E3 und E4 bleiben positiv. Dieses Ergebnis weist auf die Möglichkeit hin, daß ein Stamm in den Erdproben E3 und E4 existiert, der zunächst in der ersten PCR mit den Primern 17 und 20 (RAMISSE et al., 1996) vermehrt wird. In der nested PCR mit den Primern Cvi und Cri (BEYER, persönliche Mitteilung) wird die Sequenz dieses Stammes nicht vermehrt. Eine weitere Vermehrung in einer seminested PCR mit den Primern 17 und Cap20rev findet jedoch statt. Da die Primer 17 und Cap20rev für eine Sequenzierreaktion ungeeignet sind, ist diese Erklärung rein spekulativ und kann in dieser Untersuchung nicht bewiesen werden. Eine weitere Erklärung liegt darin, daß die Sensitivität der seminested PCR mit den Primern 17 und Cap20rev nicht ausreicht für einen positiven Nachweis aus der Erdprobe E2. Welche Stämme und wie viele unterschiedliche Stämme zu einem falsch positiven Nachweis des Plasmids pXO2 von *Bacillus anthracis* aus Bodenproben führen konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.