

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

Fachgebiet Umwelt- und Tierhygiene
Prof. Dr. R. Böhm

**ENTWICKLUNG VON
SPEZIFISCHEN PCR-ELISA NACHWEISSYSTEMEN
FÜR *COXIELLA BURNETII*, *FRANCISELLA TULARENSIS*
UND ORTHOPOCKENVIREN**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften
vorgelegt der Fakultät IV
–Agrarwissenschaften II–
der Universität Hohenheim

von
Simone Kohlhaußen
Diplom Biotechnologin
aus Braunschweig

Stuttgart-Hohenheim 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am 22.01.2001 von der Fakultät IV –Agrarwissenschaften II– der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfungen: 27./28.02.2001

Dekan:		Prof. Dr. S. Dabbert
Berichterstatter	1. Prüfer:	Prof. Dr. R. Böhm
Mitberichterstatter	2. Prüfer:	Prof. Dr. Müller
	weitere Prüfer:	Prof. Dr. W. Amselgruber
		Prof. Dr. W. Drochner

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1 EINLEITUNG	1
<hr/>	
Entwicklung von spezifischen Nachweissystemen für <i>C. burnetii</i> , <i>F. tularensis</i> und Orthopockenviren auf Grundlage der PCR	6
1.1 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	6
<hr/>	
2 LITERATUR	8
<hr/>	
2.1 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN KRANKHEITSERREGER	8
<hr/>	
2.1.1 <i>Coxiella burnetii</i>	8
2.1.2 <i>Francisella tularensis</i>	9
2.1.3 Orthopockenviren	10
2.2 NACHWEISVERFAHREN AUF DER BASIS VON PHÄNOTYPISCHEN EIGENSCHAFTEN	12
<hr/>	
2.2.1 <i>Coxiella burnetii</i>	14
2.2.2 <i>Francisella tularensis</i>	14
2.2.3 Orthopockenviren	14
2.3 NACHWEIS ZUR BASIS GENOTYPISCHER EIGENSCHAFTEN	15
<hr/>	
2.3.1 PCR-Systeme zum Nachweis der gesuchten Erreger-DNA	16
2.3.1.1 <i>Coxiella burnetii</i>	18
2.3.1.2 <i>Francisella tularensis</i>	19
2.3.1.3 Orthopockenviren	19

	SEITE
2.4 MÖGLICHKEITEN ZUR GESTALTUNG UND OPTIMIERUNG VON NACHWEISVERFAHREN AUF BASIS DER PCR	20
<hr/>	
2.4.1 Probenaufarbeitung	20
2.4.2 PCR	21
2.4.2.1 Grundlagen	21
2.4.2.2 Primer	24
2.4.2.3 Spezifität	25
2.4.2.4 Vermeidung von „falsch positiven“ Signalen	25
2.4.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle	27
2.4.3.1 Vermeidung von „falsch negativen“ Signalen	27
2.4.3.2 PCR-Mutagenese	28
2.4.4 Auswahl eines geeigneten DNA-Nachweisverfahren	31
2.4.4.1 Visualisierung von PCR-Amplifikaten	31
2.4.4.2 Spezifischer Nachweis von Amplifikationsprodukten	31
2.4.5 Nukleinsäuresonden	34
2.4.6 Festlegung von Nachweisgrenzen („cut-off“)	34
<hr/>	
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
<hr/>	
3.1 MATERIAL UND METHODEN	36
<hr/>	
3.1.1 Reagenzien	36
3.1.2 Nährmedien	36
3.1.3 Sterilisation von Materialien	36
3.1.4 Reaktionskits	36
3.1.5 Software	37
3.1.6 DNA aus Mikroorganismen	38
3.1.7 DNA-Präparation	42
3.1.7.1 Alkalische Lyse	42
3.1.7.2 DNA-Extraktion nach enzymatischem Zellaufschluß	42
3.1.8 Ermittlung der DNA-Konzentration und -Reinheit	42

	SEITE
3.1.9 PCR-Verfahren und Reaktionsansatz	44
3.1.10 Überprüfung der Amplifizierbarkeit von DNA	47
3.1.10.1 PCR-Protokoll	47
3.1.11 Agarosegel-Elektrophorese	49
3.1.12 <i>Coxiella burnetii</i> Nachweissystem	51
3.1.12.1 Oligonukleotide	51
3.1.12.2 PCR-Protokoll	52
3.1.13 <i>Francisella tularensis</i> Nachweissystem	53
3.1.13.1 Oligonukleotide	53
3.1.13.2 PCR-Protokoll A (Long <i>et al.</i>)	54
3.1.13.3 PCR-Protokoll B (Junhui <i>et al.</i>)	55
3.1.13.4 PCR-Protokoll C (Fulop <i>et al.</i>)	56
3.1.14 Orthopockenviren Nachweissystem	57
3.1.14.1 Oligonukleotide	57
3.1.14.2 PCR-Protokoll	58
Untersuchungen zur Optimierung der Systemansätze	59
3.1.15 Optimierung der PCR Reaktionsbedingungen	59
3.1.15.1 Überprüfung der Spezifität der PCR-Primer	59
3.1.15.2 Ermittlung der Sensitivität der PCR-Systeme	59
3.1.16 Optimierung des DNA-Nachweisverfahrens	60
3.1.16.1 Design von DNA-Sonden	60
A Reinigung von DNA-Amplifikaten	60
B DNA-Sequenzierung	60
3.1.16.2 Nachweis von PCR-Amplifikaten in der Mikrotiterplatte	62
A Begriffe	62
B Detektionsprinzip	62
C Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Fangsonde	63
D Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA	63
E Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	64
F Ermittlung der Nachweiseffizienz	64
G Bestimmung der Nachweisgrenze („cut-off“)	65

	SEITE
3.1.17 Implementierung einer Amplifikationskontrolle	65
3.1.17.1 In vitro Mutagenese mittels PCR	65
3.1.17.2 Kompetitive PCR	66
3.1.18 Einfluß von UNG auf die Sensitivität des PCR-ELISA	66
3.2 ERGEBNISSE	68
<hr/>	
3.2.1 DNA-Isolierung	68
3.2.2 Entwicklung eines Nachweisverfahrens für <i>Coxiella burnetii</i>	69
3.2.2.1 PCR-System	69
A Auswahl der Primer	69
B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen	70
C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität	70
D Sensitivität des PCR-Systems	71
3.2.2.2 Etablierung des Nachweissystems als PCR-ELISA	72
A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte	72
B Design der Fangsonden	73
C Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	74
D Bestimmung des „cut-off“	74
3.2.2.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle	75
A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese	76
B Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA	76
C Einstellung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration	77
3.2.2.4 Einfluß von UNG auf die Sensitivität des Nachweises mittels PCR-ELISA	79
3.2.3 Entwicklung eines Nachweisverfahrens für <i>F. tularensis</i>	83
3.2.3.1 PCR-Systeme	83
A Auswahl der Primer	83
B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen	83
C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität	84
D Alternative Primer-Systeme für <i>F. tularensis</i>	85
E Sensitivität	86

	SEITE
3.2.3.2 Etablierung des Nachweissystems als PCR-ELISA	87
A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte	88
B Design der Fangsonden	88
C Überprüfung der Spezifität des ELISA-Systems	89
D Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	90
E Nachweisgrenzen der PCR-ELISA Systeme („cut-off“)	91
3.2.3.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle	93
A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese	93
B Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA	93
C Interner Standard als Amplifikationskontrolle	94
3.2.4 Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Orthopockenviren	97
3.2.4.1 PCR-System	97
A Auswahl der Primer	97
B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen	97
C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität	98
D Sensitivität	98
3.2.4.2 Etablierung des Nachweissystems als PCR-ELISA	99
A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte	100
B Design der Fangsonden	100
C Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	101
D Nachweisgrenzen des PCR-ELISA Systems („cut-off“)	103
3.2.4.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle	104
A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese	104
B Nachweiseffizienz von Wildtyp- und Standardamplifikaten	105
C Einstellung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration	108
3.3 DISKUSSION	113
<hr/>	
3.3.1 Molekularbiologische Identifizierung von Infektionserregern	113
3.3.2 DNA-Präparation	114
3.3.3 Nachweissystem für <i>Coxiella burnetii</i>	116
3.3.3.1 Spezifität	116
3.3.3.2 Sensitivität	117
3.3.3.3 Amplifikationskontrolle	119

	SEITE
3.3.4 Nachweissystem für <i>Francisella tularensis</i>	121
3.3.4.1 Spezifität	121
3.3.4.2 Sensitivität	123
3.3.4.3 Amplifikationskontrolle	125
3.3.5 Nachweissystem für Orthopockenviren	126
3.3.5.1 Spezifität	126
3.3.5.2 Sensitivität	127
3.3.5.3 Amplifikationskontrolle	128
3.3.6 Ausblick	129
<hr/>	
4 ZUSAMMENFASSUNG	130
<hr/>	
5 SUMMARY	132
<hr/>	
6 LITERATURVERZEICHNIS	134
<hr/>	
7 ANHANG	154
<hr/>	
Danke!	164
Lebenslauf	165

ABBILDUNGEN

	SEITE
Abb. 1-1: Haupttodesursachen weltweit nach WHO	1
Abb. 2-1: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	22
Abb. 2-2: Einzelschritte zur Herstellung von interner Kontroll-DNA durch <i>in vitro</i> Mutagenese mittels PCR	30
Abb. 3-1: Grundschemata einer zur Amplifizierung durchgeführten PCR	44
Abb. 3-2: Verwendete DNA-Molekulargewichtsmarker	49
Abb. 3-3: Sensitivität des <i>Coxiella burnetii</i> PCR-Systems	71
Abb. 3-4: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs <i>Coxiella burnetii</i>	73
Abb. 3-5: Sensitivität des <i>C. burnetii</i> PCR-ELISA	75
Abb. 3-6: Ermittlung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration zur Detektion von <i>C. burnetii</i>	78
Abb. 3-7: Detektion von <i>C. burnetii</i> mittels UNG-PCR-ELISA	80
Abb. 3-8: Datenvergleich: Einfluß der Dekontamination auf den PCR-ELISA	81
Abb. 3-9: Spezifität des <i>F. tularensis</i> PCR-Systems	85
Abb. 3-10: Spezifität und Sensitivität der PCR nach Junhui <i>et al.</i> (1996)	86
Abb. 3-11: Sensitivität des <i>Francisella tularensis</i> PCR-Systems	87
Abb. 3-12: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs <i>Francisella tularensis</i>	88
Abb. 3-13: Variation der Hybridisierungstemperatur	90
Abb. 3-14: Bestimmung der Nachweisgrenze für den <i>F. tularensis</i> PCR-ELISA	92
Abb. 3-15: Nachweis von <i>F. tularensis</i> Amplifikaten nach kompetitiver PCR	95
Abb. 3-16: Sensitivität des Orthopockenviren PCR-Systems	99
Abb. 3-17: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs Orthopockenviren	101
Abb. 3-18: Variation der Einsatzmenge an Fangsonde	102
Abb. 3-19: Sensitivität des Orthopockenviren PCR-ELISA Systems	104
Abb. 3-20: Nachweiseffizienz von WT- und ST-Amplifikaten im PCR-ELISA	107
Abb. 3-21: Nachweiseffizienz von WT- und ST-Amplifikaten im ELISA unter Verwendung von modifizierten Fangsonden	107
Abb. 3-22: Kompetitive PCR und Nachweis der Amplifikate mittels ELISA	109
Abb. 3-23: Kompetitive PCR und Detektion im ELISA unter Verwendung von spezifischen Sonden mit integriertem Spacer	111
Abb. 3-24: Datenvergleich: Detektion von Orthopockenviren im ELISA unter Verwendung von spezifischen Sonden mit bzw. ohne integriertem Spacer	112
Abb. 7-1: DNA-Sequenzvergleich der <i>Coxiella burnetii</i> Amplifikate	156
Abb. 7-2: DNA-Sequenzvergleich der <i>Francisella</i> Amplifikate	160
Abb. 7-3: DNA-Sequenzvergleich der Orthopockenviren Amplifikate	161

Tabellen

	SEITE
Tabelle 2-1: PCR-Systeme zum Nachweis von <i>C. burnetii</i>	18
Tabelle 2-2: PCR-Systeme zum Nachweis von <i>F. tularensis</i>	19
Tabelle 2-3: PCR-Systeme zum Nachweis von Orthopockenviren	19
Tabelle 3-1: <i>Coxiella burnetii</i> Isolate	38
Tabelle 3-2: <i>Francisella spp.</i> Isolate	39
Tabelle 3-3: Orthopockenviren Isolate	39
Tabelle 3-4: Liste weiterer verwendeter DNA-Quellen	40
Tabelle 3-5: Komponenten eines PCR Reaktionsansatzes	45
Tabelle 3-6: Zusammensetzung verschiedener PCR-Reaktionen	45
Tabelle 3-7: Oligonukleotide für den allgemeinen DNA-Nachweis	47
Tabelle 3-8: Komponenten des Reaktionsansatzes zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit	47
Tabelle 3-9: Temperatur-Zeit-Profil der PCR	48
Tabelle 3-10: Oligonukleotide für das <i>C. burnetii</i> Nachweissystem	51
Tabelle 3-11: Komponenten des <i>Coxiella</i> -PCR Reaktionsansatzes	52
Tabelle 3-12: Temperatur-Zeit-Profil der <i>C. burnetii</i> PCR	52
Tabelle 3-13: Oligonukleotide für das <i>F. tularensis</i> Nachweissystem	53
Tabelle 3-14: Komponenten des <i>F. tularensis</i> PCR Reaktionsansatzes A	54
Tabelle 3-15: <i>F. tularensis</i> PCR Temperatur-Zeit-Profil A	54
Tabelle 3-16: Komponenten des <i>F. tularensis</i> PCR Reaktionsansatzes B	55
Tabelle 3-17: <i>F. tularensis</i> PCR Temperatur-Zeit-Profil B	55
Tabelle 3-18: Komponenten des <i>F. tularensis</i> PCR Reaktionsansatzes C	56
Tabelle 3-19: <i>F. tularensis</i> PCR Temperatur-Zeit-Profil C	56
Tabelle 3-20: Oligonukleotide für das Orthopockenviren Nachweissystem	57
Tabelle 3-21: Komponenten des Orthopockenviren-PCR	58
Tabelle 3-22: Temperatur-Zeit-Profil Orthopockenviren	58
Tabelle 3-23: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR	61
Tabelle 3-24: Temperatur-Zeit-Profil der Sequenzierung	62
Tabelle 3-25: Temperatur-Zeit-Profil der PCR-Mutagenese	66
Tabelle 3-26: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von <i>C. burnetii</i> nach dem Prinzip des ELISA	74
Tabelle 3-27: Vergleich der Nachweismethoden	89
Tabelle 3-28: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von <i>F. tularensis</i> nach dem Prinzip des ELISA	91
Tabelle 3-29: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von Orthopockenviren nach dem Prinzip des ELISA	103

ABKÜRZUNGEN

a	Atto (10^{-18})
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville Md., USA
bp	Basenpaar/e
BSA	(englisch) Rinderserumalbumin
cELISA	(englisch) capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	di-Desoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	(englisch) Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	(englisch) doppelsträngig/e (Nukleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	(englisch) Enzyme Immuno Assay
ELISA	(englisch) Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	(lateinisch) und andere
f	Femto (10^{-15})
Fa.	Firma
Fab	Antigen bindendes Fragment
g	Gramm
GÄ	Genomäquivalente
Kat.	Katalog
KBE	Kolonie bildende Einheit(en)
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
μ	Mikro (10^{-6})
mbp	Megabasenpaare
mM	Millimolar
n	Nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
p	Piko
p.a.	(lateinisch) zur Analyse
PBS	(englisch) Phosphat gepufferte Saline
PCR	(englisch) Polymerase-Kettenreaktion

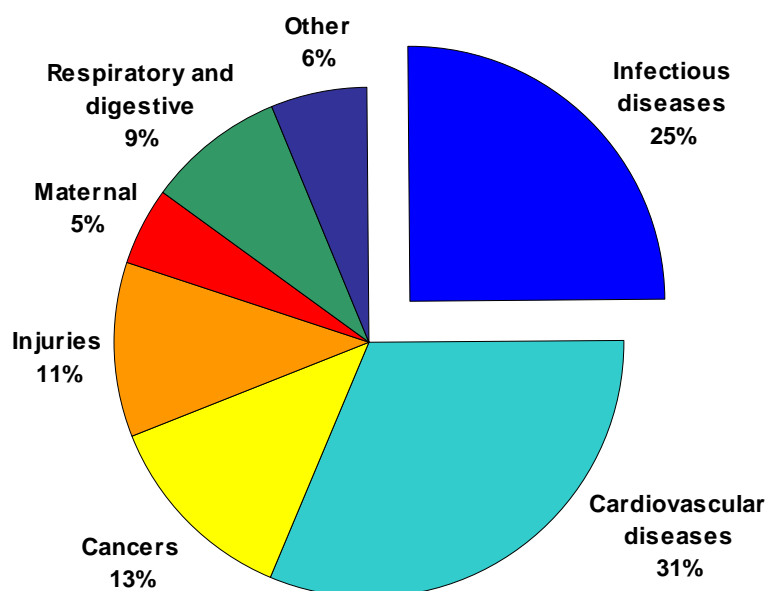
ABKÜRZUNGEN

pg	Pikogramm (10^{-12} g)
pH	negativer Dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(englisch) Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spec.	Species
ss	(englisch) einzelsträngig/e (Nukleinsäure)
SSC	Standard-Saline-Citrat Puffer
ssp.	Subspecies
ST	Standard
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA Puffer
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	(englisch) Einheit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Trotz sehr großer Erfolge bei der Entwicklung neuer Impfstoffe und Antibiotika sind Infektionskrankheiten nach wie vor weltweit die häufigste Todesursache. In der Statistik der Todesursachen rangieren die Infektionskrankheiten noch 1997 mit 33 % vor den Herz-Kreislauf Erkrankungen (29 %) und den Karzinomen (12 %) an erster Stelle (The World Health Report 1998). Zwar hat sich nach neuesten Zahlen der WHO die Häufigkeit von Infektionskrankheiten um 8 % im Vergleich zum Vorjahr vermindert (Abb. 1-1), dennoch sind Infektionserreger weltweit in jedem vierten Fall die Todesursache.

Leading causes of death
53.9 million from all causes worldwide, 1998



Note: Cancers, cardiovascular and respiratory/digestive deaths can also be caused by infections and raise the percentage of deaths due to infectious diseases even more.

Abb. 1-1: Haupttodesursachen weltweit nach WHO
(The World Health Report, 1999)

Selbst in entwickelten Ländern, wie zum Beispiel den USA oder Deutschland, steht der Tod durch Infektionen nach den Krebs- und Herz-Kreislauf-Krankheiten noch oder wieder an dritter Stelle, und dies keineswegs etwa aufgrund außerordentlicher Seuchenvorkommnisse (Pohle, 1998). Der Erfolg der Antibiotika in der Mitte des 20. Jahrhunderts und die Entwicklung effektiver Impfstrategien begründete die weitverbreitete Meinung, dass der Sieg über die Infektionskrankheiten unmittelbar

bevorstünde bzw. bereits erreicht sei. Diese Fehleinschätzung wurde durch die Entwicklung der letzten Jahre widerlegt. Krankheiten wie Malaria und Tuberkulose, die noch vor kurzem überwunden zu sein schienen, kehren mit neuer Kraft zurück. In den letzten 50 Jahren wurde nur eine Infektionskrankheit, die Pocken, ausgerottet. Einige andere wichtige Infektionskrankheiten, wie Typhus, Polio, Fleckfieber und Diphtherie wurden weitgehend zurückgedrängt; sie bleiben aber weiterhin potentielle Bedrohungen. Daneben wurde jedoch eine Vielzahl von neuen Infektionskrankheiten entdeckt. Neue Infektionen sind Folge einer Ausbreitung bisher nicht bekannter Erreger. Darunter ist auch die erstmalige Identifizierung der Erreger von lange bekannten Infektionen zu verstehen. Oder es handelt sich um das Auffinden von Erregern bei Erkrankungen, die bis dahin nicht als Erreger abhängig galten (Ruf *et al.*, 1999). Immer neue Infektionskrankheiten tauchen auf, für die bislang noch keine Heilung und kein wirksamer Impfschutz in Aussicht ist, zum Beispiel AIDS und Ebola.

Die Gründe für diese Entwicklungen sind vielseitig, denn Krankheitserreger sind enorm anpassungsfähig. Vor allem infektionsepidemiologische Veränderungen liegen der zunehmenden Bedeutung von Infektionskrankheiten zugrunde.

1. Umwelteinflüsse.

Veränderungen der Umwelt haben einen großen Einfluß auf die Ausdehnung von Brutgebieten bestimmter Überträger (Vektoren) von Infektionserregern. Dies wird zu einer Zunahme der Malaria, des Dengue- und Gelbfiebers, der Bilharziose und anderen Infektionserkrankungen führen. Veränderte Umweltbedingungen resultieren auch in einer Zunahme und Wanderung tierischer Erregerreservoirs, wie die Ausbreitung von Hantavirus Infektionen zeigt. Errungenschaften der Zivilisation tragen sogar zusätzlich zur Verbreitung von Infektionserregern bei. So erlangten Legionellen erst durch die modernen Wasserversorgungssysteme und Klimaanlage, die für sie ein ideales Reservoir darstellen, infektionsepidemiologische Bedeutung (Pohle, 1998).

2. Veränderte Infektionserreger.

Veränderungen von Infektionserregern beeinflussen ebenfalls die Infektionsepidemiologie. Hierbei handelt es sich um genetische Veränderungen, die die Immunogenität (z.B. Influenzavirus, *Vibrio cholerae*), Virulenz- und Toxinproduktion (z.B. Diphtherie, EHEC) und die Resistenz gegen Antibiotika und Virustatika (z.B. *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, HIV) beeinflussen. Zur Resistenzentwicklung von Infektionserregern trägt der Mensch ganz wesentlich durch den teilweise inadäquaten Einsatz von Antibiotika in Praxis und Klinik sowie der Antibiotikazusätze im Tiermastfutter bei. Weiterhin erleichtert die

Massentierhaltung mit ihren Auswüchsen Speziessprünge von Krankheitserregern (z.B. BSE).

3. Von Menschen verursachte Veränderungen.

Auch der Mensch selbst verantwortet Veränderungen, die der Zunahme von Infektionskrankheiten Vorschub leisten. Die Bevölkerungsexplosion, verbunden mit einer anhaltenden Verelendung und Verarmung in den Entwicklungsländern, stellt einen idealen Nährboden für Infektionen mit Tuberkulose, Typhus, Ruhr, Cholera usw. dar. Zudem schaffen die weltweite Migration, der Massentourismus, Prostitution und andere Gegebenheiten die Voraussetzung dafür, dass sich sonst lokal begrenzte Infektionen rasch ausbreiten können und Länder erreichen, in denen sie bisher nicht oder nicht mehr vorkamen. Die im heutigen Stil betriebene Landwirtschaft und die Internationalisierung des Handels tragen zur Entstehung und globalen Verbreitung von Infektionen bei.

4. Immunsuppression.

Die steigende Zahl von Menschen mit immunsuppressiven Zuständen (HIV-Infizierte, Transplantatempfänger, Tumorkranke, Hochbetagte, multimorbide Menschen) geben apathogenen bzw. fakultativ pathogenen Mikroorganismen die Chance zur Manifestation. Stellvertretend sei hier auf Pilzinfektionen, parasitäre und virale Erkrankungen sowie Mykobakteriosen hingewiesen.

5. Hospitalismus.

Die Konzentration von Schwerkranken in Krankenhäusern und der oft überzogene Einsatz von Antibiotika schaffen ideale Voraussetzungen für nosokomiale Infektionen und Erregerresistenzen.

6. Erweitertes Erregerspektrum.

Zudem erweitert sich das Erregerspektrum ständig. Allein in den letzten 20 Jahren erblickten 40 bisher unbekannte Erregerarten das Licht der wissenschaftlichen Öffentlichkeit. Darüber hinaus ermöglicht die moderne molekulare Diagnostik die Aufdeckung früher nicht nachweisbarer Mikroorganismen. Erkrankungen mit bisher unklarer Ursache erweisen sich als Infektionserkrankung (Ruf *et al.*, 1999).

Der Leitsatz (siehe unten) des „National Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention“ (USA) zur Prävention von aufkommenden Infektionskrankheiten als Strategie für das 21. Jahrhundert zeigt, dass als erster wichtiger Schritt zur Prävention die spezifische Detektion eines Infektionserregers erfolgen muß. Dies wird erst durch die Anwendung von moderner molekularer mikrobiologischer Diagnostik ermöglicht.

Die zunehmende Reisetätigkeit der Bevölkerung wie auch eine Zunahme der Auslands-einsätze der Streitkräfte zu humanitären Zwecken bewirkt also eine verstärkte Konfrontation mit fremdartigen bzw. seltenen Krankheitserregern. Die hieraus resultierenden Erkrankungen stellen hohe Anforderungen an die zu erbringende Diagnostik und Therapie (Evers, Priewer, 1999). Die korrekte Diagnosestellung ist damit die entscheidende Voraussetzung zur adäquaten Behandlung einer Infektion. Wird eine Infektion diagnostiziert, so stehen als Behandlungsziele die schnelle klinische Heilung und die Abtötung des Erregers im Vordergrund. Auswahlkriterien bei der Therapie sind daher in erster Linie Wirksamkeit und Geschwindigkeit des Wirkungseintritts. Vor der Entscheidung über die gewählte Therapie muß jedoch eine eindeutige Diagnose erstellt werden. Zur Diagnostik von Infektionskrankheiten stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Diagnose erfolgt einerseits über das klinische Bild der Infektion, andererseits wird der Erreger im Untersuchungsmaterial nachgewiesen. Diesem zweiten Ansatz kommt immer größere Bedeutung zu. Immer häufiger soll infektiöses Material aufgespürt werden, bevor es zur Infektion von Mensch oder Tier kommt. Außerdem ist durch eine eindeutige Identifikation des Krankheitserregers eine unnötige antibiotische Therapie vermeidbar, da auch neue Erkenntnisse, z.B. über Resistenzraten, berücksichtigt werden können.

Die Entwicklung schneller und sensitiver Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen ist also von großem Interesse. Besonders wichtig sind solche Schnellnachweis-Methoden in Bereichen, in denen die „biologische Sicherheit“ im Vordergrund steht. Moderne Diagnostikverfahren sind gerade im Umgang mit seltenen aber hochpathogenen Erregern der Risikoklasse 3 wie z.B. *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* oder Orthopockenviren wichtig, um bei potentiellen Erkrankungen entscheidende Hilfestellungen bei der ärztlichen Therapieentscheidung leisten zu können.

„Detect, investigate, and monitor emerging pathogens, the diseases they cause, and the factors influencing their emergence, and respond to problems as they are identified.“

(National Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, GA ; USA)

ENTWICKLUNG VON SPEZIFISCHEN NACHWEISSYSTEMEN
FÜR *C. BURNETII*, *F. TULARENSIS* UND ORTHOPOCKENVIREN
AUF GRUNDLAGE DER PCR

1.1 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In den letzten Jahren haben Verfahren, die sich molekularbiologischer Techniken bedienen, die Möglichkeiten zur Beantwortung diagnostischer, epidemiologischer und phylogenetischer Fragestellungen unter Anderem in der medizinischen Mikrobiologie erweitert.

Die Identifizierung von *C. burnetii*, *F. tularensis* und Orthopockenviren in der klinischen Diagnostik beschränkt sich zur Zeit auf mikrobiologische und biochemische Charakterisierung phänotypischer Merkmale und ist häufig mit der Anzucht der Erreger verbunden. Weil die Ausprägung der phänotypischen Merkmale neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüssen unterliegt, können die Ergebnisse dieser Nachweismethoden variieren. Dadurch ist die Zuordnung der Erreger unsicher bzw. nicht möglich. Die Ausprägung dieser Attribute ist zudem oft langwierig, was zu einer Verzögerung in der Therapieplanung führen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Nachweissysteme für *C. burnetii*, *F. tularensis* und Orthopockenviren auf Grundlage der PCR entwickelt werden, die auch für eine Anwendung im Routinelabor geeignet sind. Ziel ist der Einsatz der PCR-ELISA Systeme für den kultivierungsunabhängigen Nachweis von Krankheitserregern.

Zur Erreichung dieses Ziels sind die folgenden Schritte geplant:

- ◆ Auswahl eines geeigneten Primersystems zur Amplifikation einer für den jeweiligen Erreger spezifischen Genregion,
- ◆ Prüfung der Primer auf ihre Spezifität gegenüber verschiedenen spezifischen Isolaten und nah verwandten Spezies des jeweiligen Erregers sowie gegenüber anderen nicht verwandten (heterologen) Organismen,
- ◆ Ermittlung der Sensitivität der PCR-Systeme nach Optimierung der PCR Bedingungen,
- ◆ Design von Sonden zum spezifischen Nachweis der Amplifikate.

Um eine Automatisierung der Systeme zu ermöglichen, sollen die Hybridisierungsbedingungen für den jeweiligen selektiven Nachweis der Amplifikate in der Mikrotiterplatte als PCR-ELISA etabliert werden.

Zur Vermeidung von „falsch negativen“ Ergebnissen soll eine Amplifikationskontrolle (interner Standard) im Form einer Kontroll-DNA implementiert werden. Voraussetzung hierfür ist eine vergleichbare Amplifikationseffizienz von Proben- und Kontroll-DNA in einer kompetitiven PCR.

Um dies zu gewährleisten sind die folgenden Arbeiten vorgesehen:

- ◆ Sequenzierung und Sequenzvergleich der spezifischen Amplifikate von verschiedenen Isolaten des jeweiligen Krankheitserregers zur Lokalisation einer geeigneten Genregion,
- ◆ *in vitro* Mutagenese zur Einführung einer Substitution von ca. 20 bis 25 Basen in das Erreger spezifische Amplifikat (Herstellung der Kontroll-DNA),
- ◆ Prüfung der Sonden auf Ziel- und Kontroll-DNA in der Mikrotiterplatte, Ausschluß von Kreuzreaktion,
- ◆ Bestimmung und Einstellung der geeigneten Konzentration an Kontroll-DNA im PCR-Reaktionsansatz, Durchführung von Konkurrenzexperimenten (Kompetitive PCR),
- ◆ Bestimmung der jeweiligen Nachweisgrenze ("cut-off") der PCR-ELISA Systeme.

In Hinblick auf die Anwendung in einem Routinelabor soll das Risiko für eine Kontamination im Verlauf der Durchführung der PCR-ELISA durch Standardisierung der Protokolle und Anwendung von Dekontaminationsverfahren minimiert werden.

2 LITERATUR

2.1 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN KRANKHEITSERREGER

2.1.1 *COXIELLA BURNETII*

Die Gattung *Coxiella* wurde nach Herald Cox benannt, der 1939 einen Organismus dieser Gattung in den USA isolierte, nachdem er kurz zuvor erstmals in Australien entdeckt wurde (Derrick, 1939). Sie wird phylogenetisch der Gamma Gruppe der Proteobacteria zugeordnet. Es handelt sich dabei um kleine, obligat intrazellulär lebende, pleomorphe, kokkoide Mikroorganismen. *Coxiella burnetii* ist der Erreger der Zoonose „Q-Fieber“. Seine Verbreitung ist weltweit. In Europa ist *C. burnetii* insbesondere in Großbritannien und im Südosten verbreitet. Kleinere Endemiegebiete werden auch in Deutschland verzeichnet. Dieser Organismus wurde vormals in die Familie der Rickettsiaceae eingeordnet. Die Gefahr einer Infektion durch *Coxiella burnetii* geht von einer direkten Übertragung von Tier auf Mensch durch den Kontakt mit infizierten Tieren bzw. mit deren Körperflüssigkeiten oder Ausscheidungen aus. Der hochkontagiöse, ausgesprochen umweltresistente Erreger wird wahrscheinlich hauptsächlich aerogen übertragen. Insbesondere mit dem Urin, der Plazenta und den Lochien von infizierten Nutztieren (Schafe, Rinder etc.) werden größere Mengen an infektiösen Erregern ausgeschieden. Noch mehrere Kilometer entfernt von der infizierten Tierherde wurden menschliche Infektionen nach Inhalation von *Coxiellen* haltigem Staub verzeichnet. Auch das Verarbeiten von Fleisch oder anderen tierischen Produkten kann durch direkten Kontakt zu Infektionen führen. Übertragungen durch den Verzehr von Rohmilch sowie durch Exposition im Labor, seltener auch durch Bluttransfusionen, wurden beschrieben. Das wichtigste natürliche Reservoir stellen Nutz-, Haus-, Wild- und Beuteltiere, Vögel und Nager sowie infizierte Zecken als Zwischenwirt dar. Die Zecken verbreiten den Erreger im tierischen Reservoir. Die Dauer der Inkubation ist 2-5 Wochen, abhängig von der Infektionsdosis, in der Regel 2-3 Wochen. Nur der Mensch zeigt Krankheitssymptome. Ein Großteil der humanen Infektionen verläuft inapparent oder als milde fieberhafte Erkrankung. Nach einer kurzen unspezifischen Prodromalphase, in der die Patienten über Mattigkeit und Appetitlosigkeit klagen, kommt es zu einem raschen Fieberanstieg. Die Patienten leiden unter starken Kopf- und Muskelschmerzen (insbesondere Rückenmuskulatur), Husten, retrobulbären Schmerzen und starker Schweißneigung. Im Gegensatz zu anderen Rickettsieninfektionen wird nahezu nie ein Exanthem beobachtet. Ein Großteil der Infektionen endet selbstlimitierend nach 1–2 Wochen. Bisweilen entwickelt sich eine

atypische Pneumonie, die meist gutartig verläuft. Nur selten schreitet diese fort zu einer hämorrhagischen oder gar nekrotisierenden Pneumonie. Auch die Leber kann im Rahmen einer akut oder auch chronisch verlaufenden granulomatösen Hepatitis beteiligt sein. Selten kann auch das zentrale Nervensystem betroffen sein, und es zeigen sich neurologische Ausfallerscheinungen im Sinne einer aseptischen Meningitis oder Enzephalitis. Bisweilen kann es im Rahmen der akuten Erkrankung auch zu einer Peri- oder Endokarditis kommen. Bevorzugt lagert sich der Erreger an den Herzklappen ab und kann von dort streuend über Jahre hinweg zu wiederholten Erkrankungsausbrüchen führen (chronisches Q-Fieber). Bei chronischem Q-Fieber kann es aufgrund der anhaltenden Stimulation des Immunsystems zu einer Immunkomplexnephritis kommen. Die Letalität der unbehandelten Erkrankung liegt bei < 1% (Endokarditis). In der Therapie kommen Tetracycline zur Anwendung, bei Rückfällen erfolgt eine Therapiewiederholung. Bei Patienten mit Endokarditis ist eine Langzeittherapie mit Tetracyclinen in Kombination mit Rifampicin notwendig. Bei der Differentialdiagnose müssen Influenza, Legionellose, Mykoplasmen-Pneumonie und Viruspneumonien beachtet werden. Zur Prophylaxe werden Kontrollen der Nutztierbestände sowie deren Ektoparasiten durchgeführt. Bei der Verarbeitung der tierischen Produkte bzw. Beseitigung der Abfallprodukte, insbesondere Plazenten ist auf hygienisch adäquate Bedingungen zu achten. Wichtig ist das Pasteurisieren von Milchprodukten. Die Impfung mit dem inaktivierten Impfstoff sollte Laborpersonal vorbehalten sein. Als gesetzliche Regelung ist eine Meldepflicht bei Erkrankung und Tod eingeführt worden. Bei Abdeckern, Tierärzten o.ä. ist das Q-Fieber als Berufskrankheit anerkannt. (RKI, 1999)

2.1.2 *FRANCISELLA TULARENSIS*

Francisella tularensis ist der Erreger der bakteriellen Zoonose Tularämie. Er gehört zur Gattung *Francisella* aus der Gamma Gruppe der *Proteobacteria*. 1912 wurde dieser Mikroorganismus erstmals von McCoy und Chapin beschrieben (Holt, 1989). Dieser unbewegliche, aerobe kokkoid bis stäbchenförmige Gram-negative Mikroorganismus lebt fakultativ intrazellulär. Es sind bisher zwei humanpathogene Biovare von *Francisella tularensis* (bv *tularensis/palaeartica* bzw. Jellison type A/B) bekannt. Typ A ist assoziiert mit Zecken und Kaninchen und für den Menschen hochvirulent, während Typ B in Mosquitos und Nagetieren gefunden wurde und eine geringere Virulenz für den Menschen darstellt. Verbreitung findet *F. tularensis* in der nördlichen Hemisphäre (Russland, Japan, USA, Kanada). *F. tularensis* ist ein hochkontagiöser Erreger, aufgrund dessen sind unterschiedlichste Ansteckungsmöglichkeiten gegeben: Haut- oder Schleimhautkontakt mit infektiösem Tiermaterial, Verzehr von nicht ausreichend erhitztem, kontaminiertem Fleisch (Hasen), Übertragung durch Stechmücken (*Chrysops* und *Aedes spez.*) oder durch

Zecken (*Dermacentor* und *Amblyomma spez.*), Aufnahme mit kontaminiertem Wasser, infektiöser Staub oder durch Laborinfektionen (Inhalation des Erregers). Als Reservoir dienen vor allem Hasen, Biber und Schildzecken. Die Dauer der Inkubation ist 2-10 Tage, in der Regel 3 Tage, abhängig von Infektionsdosis, Infektionsweg und der Virulenz des Erregerstammes. Lediglich 10 bis 50 Organismen verursachen beim Menschen eine Erkrankung, wenn sie inhaliert oder intradermal injiziert werden. Dagegen werden etwa 10^8 Organismen für eine orale Infektion benötigt. Die Erkrankung kann abhängig von der Infektionsroute und der Virulenz des Erregerstammes sehr unterschiedlich verlaufen. Am häufigsten ist die ulzeroglanduläre Form. An der Eintrittsstelle (meist die Hand) entsteht ein schmerzloses Ulkus, begleitet von hohem Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen und einer schmerzhaften Schwellung der regionalen Lymphknoten (Primärstadium). Diese können eitrig einschmelzen. Bisweilen ist kein kutanes Ulkus nachweisbar, und es sind auch nur die regionalen Lymphknoten betroffen. Vom lokalen Primäraffekt ausgehend kann es zu einer Generalisation des Erregers (Sekundärstadium) kommen. Dies führt meist zu einer Lungenbeteiligung. Inhalation des Erregers führt zu einer pulmonalen Manifestation oder zu einem septischen, typhusähnlichen Krankheitsbild. Eine Infektion über den Verdauungstrakt kann zum Entstehen einer Pharyngitis (Ulzera möglich), Erbrechen, Durchfällen und abdominalen Schmerzen führen. Die Infektionen mit *F. t.* Biovar *tularensis* führen häufiger zu einer Lungenbeteiligung oder Septikämie. Die Letalität der unbehandelten Erkrankung liegt hier bei ca. 2-10%. Bei rechtzeitiger Therapie gibt es kaum Todesfälle. Es wird Streptomycin (Resistenzen bekannt) oder Gentamycin, Tobramycin, Tetracycline und Chloramphenicol zur Therapie angewandt. Eine Differentialdiagnose muß bezüglich Toxoplasmose, infektiöse Mononukleose, Tuberkulose, Brucellose, Typhus abdominalis und Pest durchgeführt werden. Prophylaktisch ist die Beseitigung und das Meiden von potentiell infektiösen Tieren sowie von Vektoren durchzuführen. Für Mitarbeiter in Laboratorien steht ein Lebendimpfstoff zur Verfügung. Nach durchgemachter Erkrankung besteht eine partielle Immunität. Eine Meldepflicht besteht bei Verdacht, Erkrankung und Tod. (RKI, 1999)

2.1.3 ORTHOPOCKENVIREN

Die Orthopockenviren zählen zu den morphologisch und genomisch größten bekannten Viren. Es handelt sich um sehr große, Backstein förmige Viren von etwa 300 x 200 nm Größe. Sie sind an der Grenze des Auflösungsvermögens gerade noch im Lichtmikroskop darstellbar und haben eine komplexe interne Struktur. Ein großes doppelsträngiges DNA Genom (ca. 200 kbp) ist von einem sog. „core“ umschlossen, das von 2 „lateral bodies“ flankiert ist. Die Oberfläche des Virus

Partikels ist von filamentösen Proteinkomponenten bedeckt, so dass der Partikel das Aussehen eines „Wollknäuels“ hat. Der gesamte Partikel ist umschlossen von einer „envelope“, die von der Wirtszellemembran abgeleitet ist. Die meisten Pockenviren sind wirtsspezifisch, Vaccinia ist dabei eine bemerkenswerte Ausnahme. Orthopockenviren sind antigenetisch sehr ähnlich, so dass eine Infektion mit einem dieser Viren auch eine Immunprotektion gegen die anderen bewirkt (Czerny *et al.*, 1994). Die Orthopockenviren vermehren sich als einzige DNA-Viren im Zytoplasma der Wirtszelle in einem abgegrenzten Bezirk, einer sogenannten „Virusfabrik“. Der Genus Orthopockenviren gehört zu der Familie der Poxviridae und umfasst 11 Spezies, von denen 4 Spezies humanpathogen sind (Variola Virus, Kuhpocken, Affenpocken und Vaccinia Virus). Das Reservoir von Variola und Alastrim (Variola minor) war ausschließlich der Mensch. Die Übertragung erfolgte direkt und, obwohl das Virus auch im getrockneten Zustand sehr resistent ist, nur selten über kontaminierte Gegenstände. Die tierischen Pockenviren werden ausschließlich durch Kontakt mit dem infizierten Tier übertragen. Variolaviren werden aerogen übertragen. Ihre Eintrittspforte sind die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes. Von dort gelangen sie in die lymphatischen Organe, wo eine Vermehrung stattfindet. Anschließend werden sie hämatogen gestreut. Nach weiterer Vermehrung gelangen sie schließlich in die Haut, wo sich die typischen Eruptionen bilden, die sich alle im gleichen Stadium befinden. Auch die Schleimhäute des Respiration- und Intestinaltraktes werden befallen. Die Letalität bei Pocken (Variola major) betrug bis zu 40 %, bei Alastrim (Variola minor) 2 %, wobei bei den letal verlaufenden Fällen häufig Bronchopneumonien Todesursache war (Kayser *et al.*, 1989). Nach der Impfung mit Vacciniavirus zeigten sich zuweilen ernsthafte Impfkomplicationen. Die Pocken (Variola) sowie die milde Verlaufsform Alastrim sind dank einer weltweiten Impfkampagne der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Laufe der 70er Jahre aus der Bevölkerung verschwunden. In den letzten Jahren wurde jedoch häufiger von Infektionen von Zootieren und Katzen berichtet (Baxby, 1988, Mahnel *et al.*, 1991). Das kürzliche Auftreten von Büffelpockenviren in Indien zeigt die Notwendigkeit fortschrittliche Technologien zur Diagnostik anzuwenden (Ibrahim *et al.*, 1997). In mikrobiologischen Laboratorien werden Vaccinia Viren häufig zu verschiedenen Forschungszwecken verwendet. Es empfiehlt sich, der potentiellen Pathogenität dieses Virus Beachtung zu schenken (Kayser *et al.*, 1989).

2.2 NACHWEISVERFAHREN AUF DER BASIS VON PHÄNOTYPISCHEN EIGENSCHAFTEN

Traditionelle Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen basieren auf dem Nachweis morphologischer und physiologischer Merkmale der Erreger. Diese Nachweisverfahren beruhen insbesondere bei der Untersuchung von Umweltproben meist auf einer unselektiven Kultur zur Wiederbelebung subletal geschädigter Mikroorganismen. Die konventionellen mikrobiologischen Kultivierungsmethoden zur Detektion von spezifischen mikrobiologischen Infektionserregern erfordern den Gebrauch von diversen Wachstumsmedien und –bedingungen, gefolgt von der Identifikation der pathogenen Organismen über ihre multiplen physiologischen Charakteristika durch eine Serie von biochemischen Tests. Diese erfordern möglicherweise die Kultivierung der Organismen in speziellen Medien. Oft werden für die Identifizierung auch miniaturisierte Testsysteme eingesetzt. Die auf Kultivierung basierenden Methoden zur Identifizierung können mehrere Tage bis zu mehreren Wochen andauern, abhängig von der Natur des nachzuweisenden infektiösen Agens.

Die Nachahmung der natürlichen Wachstumsbedingungen im Labor ist für viele Mikroorganismen aus unterschiedlichen Biotopen sehr schwierig. Oft sind sie an komplexe Bedingungen angepasst, die entsprechend im Labor nicht nachvollzogen werden können. Neben chemischen und physikalischen Kultivierungsbedingungen kann die Zusammensetzung einer Mischpopulation eine entscheidende Rolle für das Wachstum einzelner Mikroorganismen spielen (Pace *et al.*, 1986).

Ein großes Problem stellt der Nachweis von schwer kultivierbaren Mikroorganismen sowie nicht kultivierbarer Mikroorganismen dar. Nicht kultivierbare Stadien sind beispielsweise von *Vibrio cholerae* (Colwell, 1996), *Helicobacter pylori* (Shahamat *et al.*, 1993), *Campylobacter coli* (Jacob *et al.*, 1993) und *Salmonella typhimurium* (Caro *et al.*, 1999) bekannt. Von diesen pathogenen Mikroorganismen kann ein erhebliches Risiko ausgehen, wenn sie nicht erkannt werden (McKay, 1992). Bei einer Reihe von mikrobiellen Krankheitserregern ist eine Kultivierung im lebenden Tier notwendig, was wiederum einen beträchtlichen Zeit- und Versuchsaufwand erfordert.

Ferner ist der Nachweis fakultativ pathogener Spezies wie z.B. *Escherichia coli* (Johnson *et al.*, 2000) oder *Brucella spp.* schwierig. Bisher gibt es kein zufriedenstellendes mikrobiologisches Verfahren, das eine Differenzierung von pathogenen und nicht pathogenen Stämmen erlaubt. Zusätzlich werden pathogene Stämme in einer Mischkultur oft überwachsen, (Maiwald *et al.*, 1994). Weiter kann der Verlust von Plasmid-codierten Toxingenen während der Kultur zu falsch negativen Ergebnissen führen (Chosa *et al.*, 1989).

Im Laufe der Zeit wurden mikrobiologische Nachweismethoden durch die Etablierung von immunochemischen Methoden ergänzt. Grundlage dieser Verfahren ist eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion. Die Anwendung von mono- und polyklonalen Antikörpern ermöglicht einen Nachweis von Mikroorganismen über die Detektion von Oberflächenantigenen (Proteine, Glykoproteine, Lipopolysaccharide) oder spezifischen Toxinen. Beispielsweise können zur Detektion von Mikroorganismen mikroskopische Untersuchungen von verdächtigen Proben unter Verwendung von Fluoreszenz markierten poly- oder monoklonalen Antikörpern zur Anwendung kommen. In vielen Fällen wurde bei solchen auf Immunofluoreszenz basierenden mikroskopischen Identifizierungsmethoden Kreuzreaktivitäten mit anderen verwandten pathogenen Mikroorganismen gefunden, weshalb die Interpretation von positiven Ergebnissen schwierig sein kann und ein Experte notwendig ist (Mahabubani *et al.*, 1994). Viele unterschiedliche Verfahren sind hier entwickelt worden. Grundsätzlich handelt es sich immer um eine Zweischnitttechnik: Die Bindung des nachzuweisenden Antigens an den korrespondierenden spezifischen Antikörper und die quantifizierbare Nachweisreaktion. Immunologische Verfahrenen werden standardmäßig in der klinischen Diagnostik und Lebensmittelüberwachung durchgeführt. Eine der wichtigsten immunochemischen Methoden zum Nachweis von humanpathogenen Mikroorganismen ist der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Das Nachweisprinzip beruht auf der Kombination einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit der nachfolgenden Visualisierung über eine Enzym-Substrat Reaktion. Ein großes Problem dieser Methode ist die durch Genexpression und Antikörperreaktion bedingte Variabilität. Da sich Kulturbedingungen im Labor erheblich von den natürlichen Gegebenheiten unterscheiden können, kann die Produktion des jeweiligen Antigens großen Schwankungen unterliegen (Gomez-Lucia *et al.*, 1989). Konstitutive Merkmale wie die Expression von Determinanten der Zelloberfläche sind daher besser geeignet. Der Nachteil einer Anwendung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene besteht darin, dass eine Differenzierung der Mikroorganismen vielfach nur auf Gattungsebene möglich ist (Mattingly *et al.*, 1988). Die Nachweisgrenze immunochemischer Methoden liegt im allgemeinen bei 10^5 bis 10^6 Zellen pro Milliliter, was keine signifikante Verbesserung der Sensitivität im Vergleich zu biochemischen Nachweisverfahren bedeutet. Wird die geforderte Zellzahl während der kulturellen Anreicherung nicht erreicht, kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen (Wyatt *et al.*, 1995). Weitere Nachteile dieser Methoden sind bedingt durch Kreuzreaktionen der meist teuren und begrenzt haltbaren Antiseren.

Obwohl bei diesen konventionellen Nachweismethoden grundlegend verschiedene Prinzipien zur Anwendung kommen, werden stets phänotypische Merkmale der Erreger nachgewiesen. Weil die Ausprägung dieser phänotypischen Merkmale

neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüssen unterliegt, können die Ergebnisse dieser Nachweismethoden variieren.

2.2.1 COXIELLA BURNETII

Klinisch kann Q-Fieber mit Brucellose und Leptospirose verwechselt werden. Die Diagnose von Q-Fieber wird üblicherweise serologisch durchgeführt, weil diese Organismen schwierig zu kultivieren sind und ein hohes Infektionsrisiko bei der Kultivierung für das Laborpersonal besteht. Die am häufigsten angewandte Methode zur Diagnostik ist die Detektion von spezifischen Antikörpern im Serum, welche ab der 2. Krankheitswoche erfolgt. Bei serologischen Tests nutzt man die Tatsache aus, dass *C. burnetii* abhängig vom Wirtsorganismus eine Phasen-Variation durchmacht. Phase I ist die virulente Form, die in der Natur und in Labortieren gefunden wird. Nach wiederholter Passage über embryonischen Hühnereiern wandelt *C. burnetii* sich in die avirulente Form Phase II um. Diese Phasen differieren in ihren antigenen Zellwandkomponenten, Färbeverhalten und Dichte. Verschiedene serologische Tests sind zur Diagnose von Q-Fieber verfügbar, einschließlich complement fixation (CF), immunofluorescent antibody (IFA), und enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Die Diagnose von chronischem Q-Fieber zeigt sich durch einen Phase I CF-Titer gleich oder größer 1:200 bzw. wenn der Phase I IgA oder IgG Titer gleich oder größer als der durch einen immunosorbent assay bestimmten Phase II Titer ist (Vila *et al.*, 1996). Der direkte Erregernachweis aus Blut mittels Kultur oder Tierversuch ist möglich, sollte jedoch aufgrund der sehr hohen Kontagiosität Speziallaboratorien vorbehalten sein.

2.2.2 FRANCISELLA TULARENSIS

Die Erregeranzucht von *F. tularensis* aus peripherem Blut, Abstrichen und Biopsien ist aufgrund von unüblichen Kulturbedingungen schwierig. Eine Anzucht im Meerschweinchen ist möglich. Da es sich um einen hochinfektiösen Erreger handelt, sollte die Anzucht Speziallaboratorien vorbehalten sein. Die Diagnosestellung erfolgt meist serologisch durch den Nachweis spezifischer Antikörper ab der 2. Krankheitswoche. Im histologischen Präparat finden sich typische Granulome mit zentraler Nekrose. Wichtig erscheint nach wie vor die Betrachtung der klinischen Symptome, die jedoch nicht immer spezifisch für die Tularämie sind. Die so erhaltene Diagnose kann retrospectiv durch die Serologie bestätigt werden.

2.2.3 ORTHOPOCKENVIREN

Die Diagnose von Orthopockenviren kann mittels Elektronenmikroskopie von negativ gefärbtem Vesikelfluid oder gewebeverändertem Material durchgeführt werden.

Einige Pockenviren können auf der „Chorio-Allantoic-Membran“ von Hühnerembryonen kultiviert werden, wo sie Pocken bilden. Andere Pockenviren können über Zellkultur isoliert werden.

2.3 NACHWEIS ZUR BASIS GENOTYPISCHER EIGENSCHAFTEN

Als Ergänzung der klassischen Verfahren wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Methoden entwickelt, die auf den genotypischen Nachweis des Erregers basieren. Gemeinsame Grundlage dieser Methoden ist ein Nachweis auf genetischer Ebene, der weder vom Wachstumsstadium der Mikroorganismen noch von Umwelteinflüssen abhängig ist und somit als sehr spezifisch angesehen werden kann.

In Abhängigkeit der Spezifität eines Nachweissystems können verschiedene Regionen des Genoms als Zielregion verwendet werden. So wird entweder ein Gattungs-, Art- oder Spezies-spezifischer Nachweis möglich. Pathogene Mikroorganismen werden vielfach über Gene nachgewiesen, die Toxine codieren. Beispiele dafür sind das Hämolysin bei *Vibrio parahaemolyticus* (Bej *et al.*, 1999), Verotoxin bei pathogenen *E. coli* (Gilgen *et al.*, 1998), Enterotoxin bei *Yersinia enterocolitica* (Durisin, 1998) sowie Cholera toxin bei *Vibrio cholerae* (Lee *et al.*, 1993). Andere Systeme basieren auf dem Nachweis von Virulenzplasmiden (Lantz *et al.*, 1998; Ramisse *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 1996; Tsukano *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1992). Ebenso eignen sich Gene, die für spezifische Enzyme codieren, wie z.B. β -Glucuronidase (Bej *et al.* 1991). Häufige Anwendung finden auch rRNA Gene. Diese sind ubiquitär verbreitet und zeigen Unterschiede, die eine phylogenetische Zuordnung der Mikroorganismen erlauben. Dadurch können Nachweissysteme mit unterschiedlicher Spezifität auf der Basis der rRNA entwickelt werden (Woese, 1987). Ein wesentlicher Vorteil bei der Nutzung von rRNA als nachzuweisende Zielnukleinsäure ist die hohe Kopienzahl von $>10^4$ /Zelle. Alternativ können auch DNA-Bereiche mit unbekannter Funktion als Zielort verwendet werden (Fitts *et al.*, 1983; Scholl *et al.*, 1990; Gopo *et al.*, 1988). Ist die Funktion des nachzuweisenden Genortes unbekannt, bestehen jedoch erhebliche Schwierigkeiten, eine sichere Aussage bezüglich der Stabilität sowie der genetischen Variabilität zu treffen.

Obwohl der Fortschritt der auf genetische Informationen basierenden molekularen Diagnostik-Methoden zur Detektion von mikrobiellen Krankheitserregern eine schnelle Detektion verspricht, mangelt es manchen dieser Methoden an der notwendigen Sensitivität. Darüber hinaus werden für die meisten dieser Methoden spezifische genetische Informationen über die einzelnen mikrobiellen Krankheitserreger benötigt, welche nicht immer zur Verfügung stehen. Bis Ende 1988 waren die meisten der Nukleinsäure basierten klinischen Diagnostik Methoden

limitiert auf Southern Blot Analysen (DNA) und Northern Blot Analysen (RNA). Für beide Methoden wird eine große Menge an DNA bzw. RNA benötigt, was die Anwendbarkeit der Methoden limitiert. Für ein detektierbares Signal müssen ca. 1000 Zellen in der Probe sein.

Die Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und ihre Anwendung in der Diagnose von mikrobiellen Krankheitserregern hat das Potential gezeigt, die Praktiken zur Diagnose von mikrobiellen Krankheitserregern in klinischen Laboratorien zu verändern (Mahabubani *et al.*, 1994). Die PCR ist ein geeignetes *in vitro* Verfahren zur selektiven Vermehrung von DNA-Abschnitten definierter Länge und Sequenz. Die DNA Amplifikation über PCR ist eine schnelle und automatisierbare Methode. Die Natur der amplifizierten DNA kann unter Verwendung geeigneter Sonden z.B. durch DNA-DNA Hybridisierung analysiert werden. DNA Amplifikation mittels PCR in Verbindung mit Oligonukleotid basierten Methoden haben bereits eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Detektion von verschiedenen mikrobiellen Krankheitserregern in klinischen Proben bewiesen (Bej *et al.*, 1990, Bej *et al.*, 1991, Atlas *et al.* 1993, Bej *et al.*, 1993). In Abhängigkeit von der gewählten Genregion und der DNA Nachweismethode variierte die erzielte Nachweisgrenze zumeist zwischen 10^0 und 10^4 KBE pro Gramm bzw. Milliliter Probe. Die Sensitivität des Nachweises kann jedoch durch möglicherweise vorhandene Inhibitoren beeinflusst werden. Vergleichende Untersuchungen von konventionellen mikrobiologischen Verfahren mit dem Nachweis von Mikroorganismen (DNA) mittels PCR zeigten eine deutlich höhere Nachweisrate durch die letztgenannte Methode (Johansson *et al.*, 2000; Allmann *et al.*, 1995). Dies kann einerseits auf einer generell höheren Sensitivität der Methode beruhen. Andererseits besteht grundsätzlich die Möglichkeit der Erfassung von Mikroorganismen, die nicht mehr kultivierbar sind. Im Fall einer klinischen Diagnostik auf Grund von bestehenden Krankheitssymptomen ist diese Möglichkeit zu vernachlässigen. Lediglich im Falle eines Monitorings, beispielsweise von Bodenproben eines möglicherweise verseuchten Standortes, ist eine Differenzierung zwischen kultivierbaren und nicht kultivierbaren, aber dennoch lebenden Mikroorganismen notwendig.

2.3.1 PCR-SYSTEME ZUM NACHWEIS DER GESUCHTEN ERREGER-DNA

Durch die PCR werden Mikroorganismen auf genomischer Ebene nachgewiesen, d. h. unabhängig von der Ausbildung ihrer phänotypischen Merkmale. Die PCR ist eine in verschiedenen Bereichen etablierte Methode, auch in der Routinediagnostik von Infektionskrankheiten findet die PCR immer größere Verbreitung (Bessesen *et al.*, 1990, Deneer *et al.*, 1991, Ibrahim *et al.*, 1992). Ein Anwendungsgebiet der PCR ist die Frühdiagnostik von Infektionskrankheiten, da aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieser Methode schon geringste Mengen an Krankheitserregern nachgewiesen

werden können. Ein weiteres Anwendungsgebiet der PCR sind genomanalytische Verfahren zur Identifizierung von Anlagen für erbliche Defekte.

Die Einsetzbarkeit der PCR für den Nachweis von Krankheitserregern wird vor allem davon bestimmt, wieviel von der Sequenz eines Organismus bereits bekannt ist. Jede DNA-Sequenz, auf die sich eine Diagnose stützen soll, darf nur für den entsprechenden Organismus oder die Gruppe von Organismen charakteristisch sein. Andernfalls können falsch positive Resultate Fehldiagnosen verursachen. Darüber hinaus besteht häufig das Problem, dass der Erreger innerhalb einer großen Menge von Wirts-DNA nachgewiesen werden muß. Deshalb ist es wichtig, für einen spezifischen Nachweis die Abgrenzung gegenüber dem Wirt sicherzustellen, sowie die Signale unspezifischer Amplikons zu minimieren und die Empfindlichkeit des Tests so weit wie möglich zu steigern (Newton *et al.*, 1994). Tabelle 2-1 bis 2-3 zeigt eine Übersicht der PCR Systeme und der zugehörigen Zielregionen, die zum Nachweis von *C. burnetii*, *F. tularensis* und Orthopockenviren entwickelt wurden.

2.3.1.1 *Coxiella burnetii*Tabelle 2-1: PCR-Systeme zum Nachweis von *C. burnetii*

Genregion	Nachweissystem	Referenz
<i>gyrA</i> Gen	PCR-RFLP	Spyridaki <i>et al.</i> , 2000
<i>IS1111</i> Sequenz, <i>SOD</i> Gen	PCR	Berri <i>et al.</i> , 2000
<i>icd</i> Gen	PCR- RFLP	Nguyen SV, Hirai K, 1999
	PCR, Gel	Ermel RW, 1999
<i>com1/mucZ</i> Gen	PCR, NotI PFGE	Sekeyova <i>et al.</i> , 1999
<i>IS1111a</i> Gen	PCR-ELISA (IS)	Courtney <i>et al.</i> , 1999
<i>IS1111</i> Sequenz	multiplex PCR, Gel	Edingloh <i>et al.</i> , 1999
<i>IS1111</i> Sequenz	PCR, Gel	Lorenz <i>et al.</i> , 1998
	nested PCR, IF Test	To <i>et al.</i> , 1998
<i>com1</i> Gen	nested PCR, Gel	Kato <i>et al.</i> , 1998
<i>com1</i> Gen Plasmid QpH1/QpRS	nested PCR, Gel	Zhang <i>et al.</i> , 1998
<i>com1</i> Gen	nested PCR, Restriktionsanalyse, IF Test	Zhang <i>et al.</i> , 1998
	nested PCR, RFLP	Spyridaki <i>et al.</i> , 1998
<i>SOD</i> Gen	PCR-ELISA	Muramatsu <i>et al.</i> , 1997
23S rRNA Gen	PCR, Restriktionsanalyse	Ibrahim <i>et al.</i> , 1997
<i>com1</i> Gen		Zhang <i>et al.</i> , 1997
16S-23S rDNA (ITS)	PCR	Stein <i>et al.</i> , 1997
	IMS and PCR	Muramatsu <i>et al.</i> , 1996
<i>htpB</i> Gen	PCR, Restriktionsanalyse	Yuasa <i>et al.</i> , 1996
	nested PCR	To <i>et al.</i> , 1996
QpH1 Plasmid	PCR, CMHA	Fritz <i>et al.</i> , 1995
<i>IS1111</i> Sequenz	PCR, Gel	Willems <i>et al.</i> , 1994
16S rRNA, Plasmid QpH1/QpRS/QpDG	nested PCR Capture-ELISA	Willems <i>et al.</i> , 1993
<i>SOD</i> Gen	PCR, Restriktionsanalyse	Stein <i>et al.</i> , 1992
Plasmid QpH1/QpRS	PCR, Gel	Frazier <i>et al.</i> , 1992
Plasmid QpH1/QpRS/QpDG	PCR, Gel	Thiele <i>et al.</i> , 1992
Plasmid QpH1/QpRS	PCR, DNA-Hybridisation	Mallavia <i>et al.</i> , 1990
16S rRNA Gen	PCR, Southern-Blot	Frazier <i>et al.</i> , 1990

2.3.1.2 *Francisella tularensis*

Tabelle 2-2: PCR-Systeme zum Nachweis von *F. tularensis*

Genregion	Nachweissystem	Referenz
<i>FopA</i> , <i>TUL4</i> Gen	5'-Nuklease-PCR, PCR-EIA	Higgins <i>et al.</i> , 2000
<i>TUL4</i> Gen	PCR, Gel	Grunow <i>et al.</i> , 2000
16S rRNA	kompetitive PCR, Gel	Johansson <i>et al.</i> , 2000
<i>TUL4</i> Gen	LC-PCR	Shaw <i>et al.</i> , 1998
16S rDNA Gen	PCR, Gel	Dolan <i>et al.</i> , 1998
16S rRNA, <i>TUL4</i> Gen	multiplex PCR, Southern-Blot	Sjostedt <i>et al.</i> , 1997
<i>TUL4</i> Gen	PCR, Restriktionsanalyse	Junhui <i>et al.</i> , 1996
<i>FopA</i> Gen	nested PCR, Gel	Fulop <i>et al.</i> , 1996
	PCR, Gel	Romanova <i>et al.</i> , 1995
16S rDNA Gen	PCR, Gel	Forsman <i>et al.</i> , 1994
<i>TUL4</i> Gen	PCR, Gel, Dot-Blot	Long <i>et al.</i> , 1993

2.3.1.3 Orthopockenviren

Tabelle 2-3: PCR-Systeme zum Nachweis von Orthopockenviren

Genregion	Nachweissystem	Referenz
	PCR	Hinrichs <i>et al.</i> , 1999
<i>HA</i> Gen	Microchip PCR	Ibrahim <i>et al.</i> , 1998
<i>ATI</i> Gen (Monkeypox)	PCR, Gel	Neubauer <i>et al.</i> , 1998
<i>TK</i> bzw. <i>ATIP</i> Gen	PCR	Sandvik <i>et al.</i> , 1998
14-kDa Gen	PCR, Gel	Meyer (pers. comm. 1998)
<i>ATI</i> Gen	PCR	Czerny <i>et al.</i> , 1997
<i>HA</i> Gen	5' Nuklease PCR Assay	Ibrahim <i>et al.</i> , 1997
<i>HA</i> Gen	PCR	Ropp <i>et al.</i> , 1995

2.4 MÖGLICHKEITEN ZUR GESTALTUNG UND OPTIMIERUNG VON NACHWEISVERFAHREN AUF BASIS DER PCR

Die Anforderungen der für die hier beschriebenen hochpathogenen Mikroorganismen einsetzbaren Nachweisverfahren müssen den Eigenschaften zuverlässig, schnell, sensitiv und spezifisch gerecht werden.

Generell sind für eine erfolgreiche Detektion von mikrobiellen Krankheitserregern aus klinischen und anderen Materialien drei Schritte erforderlich: (1) Die Probenaufarbeitung, (2) eine DNA Amplifikation über PCR und (3) die Analyse und Identifikation der amplifizierten DNA.

2.4.1 PROBENAUFARBEITUNG

Der Nutzen der PCR basierten Detektion von Mikroorganismen in komplexen biologischen Proben wie klinischen, Umwelt- und Nahrungsmittelproben wird zum Teil durch Anwesenheit von Substanzen begrenzt, die die PCR hemmen, die Amplifikationseffizienz verringern oder in anderer Weise die Reaktion beeinflussen. Allgemeine Inhibitoren umfassen verschiedene Bestandteile von Körperfluids, Reagenzien aus dem klinischen Bereich, Nahrungsmittelbestandteilen und Umweltproben. Andere, weit verbreitete Inhibitoren schließen Bestandteile der bakteriellen Zellen, der Nicht-Ziel-DNA und der Laborgegenstände wie z.B. Laborplastikwaren und Zellulose mit ein (Wilson, 1997). Verschiedene Arbeitsgruppen haben über die inhibitorische Wirkung verschiedenster Stoffe wie z.B. Phenole und Huminsäuren, Hämoglobin und deren Abbauprodukte u.a. berichtet (Johnson *et al.*, 1995; Lantz *et al.*, 1994; Mariani *et al.*, 1995; Panaccio und Lew, 1991; Rossen *et al.*, 1992; Tsai und Olsen, 1992; Widjoatmodjo *et al.*, 1992; Wiedbrauk *et al.*, 1995). PCR Inhibitoren können durch einen oder mehrere der folgenden Mechanismen wirken: (i) Störung der Zelllyse, (ii) Abbau der oder Anlagerung an die DNA, oder (iii) Inaktivierung der hitzebeständigen DNA-Polymerase (Al-Soud, Radström, 1998). Insgesamt beeinflussen diese Stoffe die Sensitivität des Nachweises zum Teil erheblich. Die Konzentration der Hemmstoffe kann im einfachsten Fall durch Verdünnung der zu untersuchenden Probe oder mit Hilfe von mehr oder weniger aufwendigen Reinigungsverfahren herabgesetzt werden (Higuchi, 1989). Die Reinigung von DNA ist ggf. mit Verlust von Ziel-DNA verbunden. Eine weitere Möglichkeit zur Eliminierung von PCR Inhibitoren ist die Isolierung der nachzuweisenden Mikroorganismen durch Kultivierung im Gegensatz zur Gesamt-DNA-Extraktion. Durch die vorgeschaltete Kultivierung kann bei der anschließenden PCR eine Inhibition weitgehend ausgeschlossen werden (Scheu, 1999). Der

entscheidende Vorteil einer Zeitersparnis und ggf. einer Minimierung des Gefährdungspotentials bei hochpathogenen Erregern durch den Einsatz der PCR ohne vorherige Kultivierung ist dann nicht mehr gegeben. Die Neutralisation von Inhibitionseffekten durch Substanzen wie Rinderserumalbumin (BSA), T4 Gene 32 Protein oder Tween 20 wurde mehrfach beschrieben (Kreader, 1996; Tebbe *et al.*, 1993; Beyer *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 1998). Allerdings ist die Wirkungsweise dieser Substanzen bisher unzureichend geklärt und damit die neutralisierende Wirkung nicht garantiert (Newton *et al.*, 1994).

Die Menge und Reinheit der in die PCR eingesetzten DNA beeinflusst maßgeblich das Ergebnis von PCR-basierten Nachweisverfahren. Bei der Auswahl eines Verfahrens zur Probenaufarbeitung müssen potentielle Inhibitoren in Abhängigkeit der zu untersuchenden Proben berücksichtigt werden.

2.4.2 PCR

2.4.2.1 Grundlagen

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Bereiches, der von zwei Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird, die jeweils am Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereiches liegen (Ibelgauffs, 1993). Diese Methode wurde 1986 bzw. 1987 erstmals von Mullis *et al.* veröffentlicht.

Die zyklisch verlaufende thermische Reaktion besteht aus drei Schritten mit unterschiedlichen Temperaturen (Abb. 2-1). Im ersten Schritt wird die DNA durch Temperaturerhöhung denaturiert und so die doppelsträngigen Moleküle aufgeschmolzen und in Einzelstränge verwandelt. Durch Temperaturabsenkung werden im zweiten Schritt wieder Basenpaarungen ausgebildet, dabei lagern sich die Primer an die jeweiligen komplementären Regionen auf der DNA-Matrize (Annealing). Solche kurzen basengepaarten Regionen werden im dritten Schritt von DNA-Polymerasen zur Initiation benötigt, um eine DNA-Neusynthese zu starten (DNA-Synthese). Der neu synthetisierte DNA-Strang kann dann in einem folgenden Zyklus nach Denaturierung wieder als Matrize für die nächste Syntheserunde dienen. Auf diese Weise lässt sich die Anzahl der Ziel-DNA-Fragmente, solange ausreichend Primer und freie Nukleotide als Bausteine vorhanden sind, theoretisch in jedem Durchgang verdoppeln.

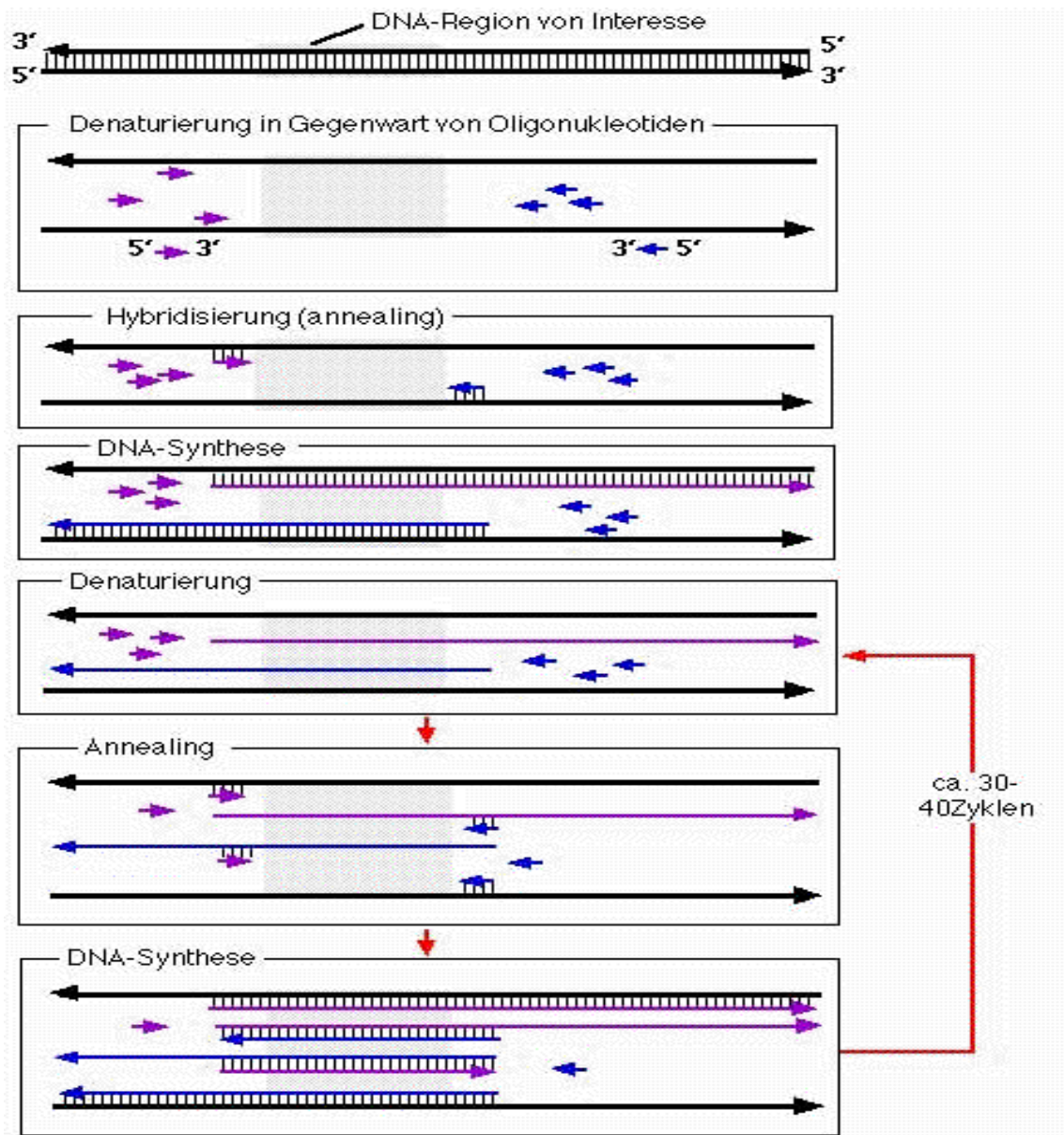


Abb. 2-1: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
 (Quelle: <http://www.biologie.uni-ulm.de/bio2/knoop/met.html#pcr>)

Nach einer initialen Denaturierung der DNA durch Hitze erfolgt die komplementäre Anlagerung der spezifischen Primer. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase werden anschließend die Primer entsprechend der komplementären DNA-Matrize verlängert. Die entstandenen Amplifikate dienen in dem zyklisch verlaufenden Prozeß dann ebenfalls als Ziel-DNA, wodurch es zu einer exponentiellen Zunahme des synthetisierten DNA-Fragmentes kommt.

Theoretisch können also aus einem einzigen DNA-Molekül nach 30 Zyklen 2^{30} Moleküle einer bestimmten Region erhalten werden. Da die Amplifikationseffizienz variiert, kann die Zunahme der Amplifikate (N) entsprechend der Formel $N = N_0(1+E)^n$ berechnet werden. Dabei ist N_0 die initiale Anzahl von Molekülen, n die Anzahl der Zyklen und E die Amplifikationseffizienz, die einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann.

In jedem PCR-Zyklus werden die drei Temperaturen zur Denaturierung der DNA (z.B. 94°C), Hybridisierung der Oligonukleotide (z.B. 50°C) und Synthese der DNA (z.B. 72°C) durchlaufen. Ein wichtiger Aspekt der Automatisierung war deshalb die Verwendung einer hitze-resistenten Polymerase (*Taq*-Polymerase) aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*), die den Hochtemperaturschritt zur DNA-Denaturierung übersteht und darum nicht bei jedem Zyklus neu supplementiert werden muß.

Neben der beschriebenen „klassischen Form“ der PCR gibt es die sog. „Multiplex PCR“, bei der unter Verwendung mehrerer Primerpaare in einer Reaktion unterschiedliche DNA-Matrizen simultan amplifiziert werden können.

Eine weitere Möglichkeit ist die verschachtelte sog. „nested PCR“. Die inneren Primer dieser verschachtelten PCR hybridisieren innerhalb des Abschnittes, der von dem ersten äußeren Primerpaar vorgegeben wird. Das größere DNA-Molekül, das in der ersten PCR-Runde entstanden ist, dient in einer zweiten PCR als Matrize. Durch die verschachtelte PCR erhöht sich die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich. Die Spezifität ist deshalb so groß, weil bei dieser Methode nahezu alle falschen unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Denn nach der ersten PCR-Runde bieten die unspezifischen Produkte nicht mehr genügend komplementäre Sequenzen für die inneren Primer und stehen damit in den weiteren Runden nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Aus diesem Grund wird vorzugsweise die Zielsequenz amplifiziert. Durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode wächst allerdings auch die Anfälligkeit für Kontaminationen (Newton *et al.*, 1994).

Eine andere Möglichkeit die Spezifität der PCR zu erhöhen ist die sog. „touchdown“ PCR. Dabei sind die Bedingungen für die Zyklen so gewählt, dass im Wesentlichen das gewünschte Amplifikat gebildet wird und nur wenige Artefakte und Primerdimere entstehen. Während der ersten „touchdown“ PCR Zyklen wird die Anlagerungstemperatur kontinuierlich von einem Wert oberhalb der zu erwartenden Schmelztemperatur (T_m) auf einen Wert unter T_m abgesenkt. Die ursprüngliche Intention der „touchdown“ PCR war allerdings, den komplizierten Prozeß der Determinierung der optimalen Annealing Temperatur zu vereinfachen. Allgemein gilt, dass jede Differenz in der Schmelztemperatur zwischen korrektem und unkorrektem Annealing eine zweifache Differenz der Produktmenge pro Zyklus bedeutet, was das Verhältnis zwischen korrektem und unkorrektem Produkt beeinflusst (Don *et al.*, 1991).

Die PCR ist eine sehr sensible Technik, die von vielen Faktoren beeinflusst wird. Dies sind z.B. die Konzentrationen der Reaktionskomponenten, die Temperatur, die Qualität der Ziel-DNA und vor allem die ausgewählten Primer. Alle Komponenten müssen jeweils für einen optimalen Ablauf der PCR angepaßt werden, um einen möglichst sensitiven und spezifischen Nachweis zu ermöglichen.

2.4.2.2 Primer

Primer sind mehr als jede andere Reaktionskomponente für Erfolg oder Mißerfolg einer Amplifikationsreaktion entscheidend. Dennoch bleibt die Auswahl von leistungsfähigen und spezifischen Primern teilweise empirisch (Sakai, 1989). Im allgemeinen reichen für die Konstruktion dieser Oligonukleotide einige einfache Richtlinien aus. Darüber hinaus gibt es auch diverse Computerprogramme, die die Primerentwicklung unterstützen (Newton *et al.*, 1994). In der Regel sind PCR-Primer zwischen 15 und 30 Nukleotiden lang. Nach Möglichkeit sollten die Primer eine zufällige Basenverteilung haben, wobei die Basenzusammensetzung ähnlich der des zu amplifizierenden Fragmentes sein sollte. Ein Primerpaar sollte insbesondere am 3'-Ende weder inter- noch intramolekular komplementär sein. Andernfalls können sich sog. Primerdimere ausbilden, die die Amplifikationseffizienz der Ziel-DNA negativ beeinflussen. Generell müssen Primer genau komplementär zur DNA-Matrize sein. Für einige Anwendungen wie beispielsweise die PCR-Mutagenese können jedoch nicht-komplementäre exogene Sequenzen an das 5'-Ende der Primer hinzugefügt werden.

Die Spezifität jedes PCR-Systems hängt davon ab, wie gut die Primer im Vergleich zu unspezifischen Abschnitten der Matrize an die Ziel-DNA hybridisieren. Nicht spezifische Primer reduzieren, wenn sie in der PCR verlängert werden, nicht nur die Anzahl der Primer, die für das gesuchte Amplikon zur Verfügung stehen, sondern begünstigen auch Artefakte und falsch positive wie falsch negative Ergebnisse (Newton *et al.*, 1994). Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Anlagerung der Primer. In Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der Primer kann eine optimale Annealingtemperatur nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$T_a = T_m - 5 \text{ °C} = 2x (A+T) + 4x (G+C) - 5 \text{ °C} \quad (\text{Suggs } et al., 1981)$$

Programme wie OLIGO-Applet[®] berücksichtigen auch die Besonderheiten des jeweiligen Primers wie komplementäre Bereiche und Sekundärstrukturen, und berechnen die geeignete Bindungstemperatur sowie die Schmelztemperatur (Newton *et al.*, 1994). Je höher die Annealingtemperatur gewählt wird, desto eher wird ein sog. „Mispriming“, also ein Anlagern des Primers an einer falschen Stelle der einzelsträngigen Ziel-DNA verhindert und damit die Spezifität der PCR gesteigert (Bej *et al.*, 1991).

2.4.2.3 Spezifität

Neben den im vorangegangenen Abschnitt bezüglich der verwendeten Primer beschriebenen Faktoren zur Steigerung der Spezifität der PCR-Reaktion sind verschiedene andere Möglichkeiten bekannt. Die verschachtelte PCR („nested PCR“) und die „touchdown“ PCR wurden bereits im Abschnitt Grundlagen kurz beschrieben. Ferner ist eine Verbesserung der Spezifität der PCR durch Reduzierung verschiedener Reaktionskomponenten (Primer, Magnesiumionen, *Taq*-Polymerase, dNTP' s) oder auch der Anzahl der Zyklen möglich. Die Minimierung der Inkubationszeit während des Annealing- und des Syntheseschrittes begrenzt die Gelegenheiten für Misspriming und die Synthese anderer Moleküle (Sakai, 1989). Alle Veränderungen des PCR Protokolls zugunsten der Spezifität der Reaktion können auch die Sensitivität beeinflussen.

2.4.2.4 Vermeidung von „falsch positiven“ Signalen

Eine hochempfindliche Methode wie die PCR birgt die Gefahr, dass schon geringste Kontaminationen zu falsch positiven Ergebnissen führen. In der Literatur werden verschiedene Kontaminationsquellen beschrieben. Die „cross over“ Kontamination entsteht durch den unbeabsichtigten Transfer von Ziel-DNA von einem Probengefäß zum nächsten. Eine Kontamination durch rekombinante Plasmide aus der Laborumgebung, die die Ziel-DNA enthalten, wird als Plasmidkontamination bezeichnet. Die „carry-over“ Kontamination stellt das größte Risiko für Kontamination dar (Longo *et al.*, 1990). Dabei ist das PCR Produkt die Ursache der Kontamination. Die Amplifikate reichern sich bei wiederholter Durchführung eines Nachweises natürlicherweise im Labor an.

Von Kwok und Higuchi (1989) wurden Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen ausführlich dargestellt. Die Probenaufarbeitung sowie die Vorbereitung und Durchführung der PCR werden räumlich isoliert. Mit dieser räumlichen Isolierung geht die Trennung von Arbeitsmaterialien und Reagenzien einher. Die Arbeitsplätze werden mit UV-Licht bestrahlt, um kontaminierende DNA zu degradieren. Eine räumliche Trennung der Arbeitsschritte (Herstellung der Reaktionslösungen, DNA-Extraktion, PCR, Nachweis der PCR-Produkte) wird zur Detektion verschiedener humanpathogener Erreger wie Herpes Simplex Virus, *Helicobacter pylori*, Hepatitis B Virus und *Mycobacterium tuberculosis* empfohlen. (Kessler *et al.*, 1994; Lage *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1990; Kox *et al.*, 1994). In jedem Raum sollten jeweils ausschließlich dort verwendete Arbeitskittel, Handschuhe und Pipetten zur Verfügung stehen.

Die für die PCR verwendeten Reaktionslösungen sowie die Reagenzien für die DNA-Extraktion sollten zur Vermeidung von Kontaminationen aliquotiert werden (Kwok und Higuchi, 1989; Kessler *et al.*, 1994; Kox *et al.*, 1994). Ferner wird empfohlen,

soweit möglich Reagenzien sowie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zu autoklavieren. Das Tragen und frequente Wechseln von Einmal-Handschuhen trägt ebenfalls zur Verminderung des Kontaminationsrisikos bei. Bei der Durchführung der PCR wird zunächst ein sogenannter „Prä- oder Mastermix“ hergestellt und anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Die DNA wird im letzten Schritt zu den Reaktionsansätzen hinzugefügt (Kwok und Higuchi, 1989).

Wichtig bei der Durchführung einer PCR ist, dass eine ausreichende Menge an Kontrollreaktionen mitgeführt wird (Kox *et al.*, 1996; Noordhoek *et al.*, 1995). Negativkontrollen stellen dabei einen Indikator für Kontaminationen dar, während Positivkontrollen den erwartungsgemäßen Verlauf der PCR anzeigen. Ist die Negativkontrolle positiv, liegt eine Kontamination vor. Im Fall einer negativen Positivkontrolle können Fehler bei der Durchführung vorliegen. In beiden Fällen muß die PCR wiederholt werden.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wird von einigen Arbeitsgruppen die Verwendung von UV-Licht beschrieben. Sarkar und Sommer (1990) sowie Cimino *et al.* (1990) bestrahlen Reaktionsgefäße inklusive Reaktionsansatz (Prämix ohne Ziel-DNA) zur Dekontamination bei einer Wellenlänge von 254 – 300 nm für 5 – 20 Minuten mit UV-Licht. Ferner wird die regelmäßige Bestrahlung von Arbeitsflächen und –utensilien beschrieben, um ein potentiell Kontaminationsrisiko zu mindern (Cone und Fairfax, 1993, Kwok und Higuchi, 1989). Durch UV-Bestrahlung wird kontaminierende DNA in PCR-Gefäßen so weit zerstört, das sie nicht mehr vermehrt werden kann. Trockene DNA muß dem UV-Licht länger ausgesetzt werden als DNA-Lösungen (Cone und Fairfax, 1993). Verschiedene Parameter wie der Gehalt an Pyrimidinen (Thymidin), die Länge der DNA, die Bestrahlungszeit, der Abstand von der UV-Quelle sowie die Wellenlänge und Energie der Strahlung beeinflussen die Empfindlichkeit von DNA gegenüber UV-Einwirkungen.

Des weiteren können die PCR-Reaktionsansätze mit Hilfe der Uracil-N-Glycosylase (UNG) vor Beginn der Amplifikationsreaktion enzymatisch dekontaminiert werden (Kunakorn *et al.*, 1999; Gualillo *et al.*, 1999; Denis *et al.*, 1997; Longo *et al.*, 1990). Die *Taq*-DNA-Polymerase hat eine ähnliche Affinität zu dUTP und zu dTTP. Deshalb kann im PCR-Reaktionsansatz dTTP durch dUTP, dem Substrat der UNG ersetzt werden. Die Amplifikate enthalten dann Uracil, das Substrat des Enzyms Uracil-N-Glycosylase (UNG). Die UNG katalysiert die Hydrolyse uracilhaltiger Nukleinsäuren. So kann unter Verwendung von dUTP zur Amplifikation und einer der PCR vorgeschalteten Dekontamination mittels UNG die Kontamination durch frühere Amplifikate ausgeschlossen werden. Da der Einbau von dUTP nicht generell bei jedem PCR-System möglich ist und teilweise zu einer reduzierten Sensitivität führt, muß dies jeweils für das ausgewählte PCR-System untersucht werden.

Eine andere Methode wird von Longo *et al.* (1990) beschrieben. Um Kontaminationen auszuschalten, werden hier dUTP haltige Primer verwendet. Die

Behandlung mit UNG verhindert dann, dass übertragene Amplifikate weiter vermehrt werden. Allerdings stellt das nachträgliche Zusetzen der Primer zur PCR wiederum eine Kontaminationsquelle dar.

Rys und Persing (1993) verwenden drei verschiedene Methoden zur Prävention von falsch positiven PCR Resultaten. Neben der beschriebenen Anwendung von UNG zusammen mit dUTP kommen zwei im Anschluß an eine PCR (post-PCR) durchgeführte Reaktionen zur Inaktivierung der Amplifikationsprodukte zur Anwendung. Das cross-linking mit Isopsoralen und die alkalische Hydrolyse von Amplifikaten, die Primer mit 3'-Ribose-Resten enthalten, verhindert die erneute Amplifikation der modifizierten PCR-Produkte. Die routinemäßige Anwendung von mindestens einer der drei Methoden hilft, falsch positive Ergebnisse auf Grund von „carry-over“ Kontaminationen zu vermeiden (Rys und Persing, 1993).

2.4.3 IMPLEMENTIERUNG EINER AMPLIFIKATIONSKONTROLLE

2.4.3.1 Vermeidung von „falsch negativen“ Signalen

Als Ursache für falsch negative Ergebnisse spielen bei der Anwendung der PCR inhibitorisch wirkende Substanzen eine große Rolle. Die genauen Wirkungsmechanismen, die zu einer Inhibition der PCR führen, sind bisher kaum untersucht. Inhibitorisch kann die Anwesenheit von Substanzen wirken, die zur Komplexierung von Magnesiumionen führen. Ein weiterer Grund kann eine Degradierung der Ziel-DNA wie auch der Primer durch Nukleasen darstellen. In vielen Fällen wird die DNA-Polymerase direkt inhibiert. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, sollte ein „internes Standard Molekül“ als Indikator für die Effektivität der Reaktion verwendet werden (Ballagi-Pordany, Belak, 1996). Dafür bestehen zwei Möglichkeiten: entweder durch die Amplifikation einer Kontroll-DNA in derselben oder in einer gesonderten Reaktion. Bei der zuletzt genannten Möglichkeit ist jedoch nicht sichergestellt, dass die Reaktionsbedingungen in den verschiedenen Ansätzen identisch ist. Um unterschiedliche Amplifikationseffizienzen für die nachzuweisende spezifische Sequenz und die Kontrollsequenz zu vermeiden, sollte die Amplifikation mit einem Primerpaar für beide Matrizen der Verwendung von verschiedenen Primersystemen („multiplex PCR“) vorgezogen werden. Die Methode der Wahl zum Ausschluß von PCR-Inhibitionen ist der Zusatz eines sog. „internen Standards“ (Abravaya *et al.*, 2000, Courtney *et al.*, 1999, Rosenstraus *et al.*, 1998, Denis *et al.*, 1997, Jin *et al.*, 1994, Kolk *et al.*, 1994, Ulrich *et al.*, 1993). Dabei handelt es sich um eine Kontroll-DNA, die in einer definierten Menge der Amplifikationsreaktion zugesetzt und parallel amplifiziert wird. Bei der kompetitiven PCR werden die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA mit demselben Primerpaar

amplifiziert. Die maximalen Forderungen an das Design einer solchen Kontroll-DNA sollen sicherstellen, dass keine Unterschiede in der Amplifikationseffizienz auftreten. Wesentlich ist die gleiche Länge der resultierenden Amplifikationsprodukte unter Verwendung identischer Primer zur Amplifikation von Wildtyp- und Kontroll-DNA. Wichtig ist ebenso ein möglichst identischer GC-Gehalt der beiden PCR-Matrizen. Eine mögliche Methode zur Herstellung von Kontroll-DNA als internen Standard ist die PCR-Mutagenese, die im nachfolgenden Kapitel erläutert wird.

Da sich die bei einer kompetitiven PCR mit einer Kontroll-DNA nach den oben beschriebenen Maßgaben entstehenden Amplifikate mangels Größenunterschied nach einer Gelelektrophorese nicht unterscheiden lassen, ist ein Nachweis beider PCR Produkte über ein anderes DNA-Nachweisverfahren notwendig.

2.4.3.2 PCR-Mutagenese

Zur Herstellung der o.g. Kontroll-DNA (interner Standard) zur Nutzung als Amplifikationskontrolle zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse in der PCR kann die „PCR *in vitro* Mutagenese“ eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um ein einfaches und effektives Verfahren, um beispielsweise Insertionen und Substitutionsmutationen in die DNA einzuschleusen.

Um möglichst gleiche biophysikalische Bedingungen bei der Amplifikation von Ziel-DNA und Kontroll-DNA zu gewährleisten, sollte sich die interne Standard-DNA so wenig wie möglich von der Ziel-DNA unterscheiden. Kommt zum Nachweis von Wildtyp- und Kontroll-DNA eine DNA-Hybridisierungsmethode zur Anwendung, müssen neben möglichst gleichen Amplifikationsbedingungen auch identische Hybridisierungsbedingungen für Wildtyp- und Kontroll-DNA (ST-DNA) erzeugt werden.

Die gezielte Herstellung einer internen Kontroll-DNA erfolgt beispielsweise nach der Methode des „Scramble-Priming“. Um unerwünschte Reamplifikationseffekte zu vermeiden, wählt man hierzu zwei Primer (A1 / A2), welche außerhalb des Wildtyp-Amplifikates (P1 / P2) liegen und dieses umspannen. Ferner werden zwei weiter innen-liegende Mutationsprimer (I 1 / I 2) so gelegt, dass sie neben flankierenden Sequenzen jeweils komplementär zueinander an ihrem 5'-Ende einen in Länge und Basenzusammensetzung definierten Sequenzabschnitt enthalten, der genau mit der Lage der gewählten Fangsonde für das spätere ST-Amplifikat zusammenfällt. Nun erfolgt in einem ersten Schritt die Durchführung von zwei PCR-Reaktionen (A1 / I 2) bzw. (A2 / I 1) in separaten Ansätzen zur Herstellung der beiden Teilamplifikate. Nach erfolgter PCR werden die resultierenden Amplifikationsprodukte gereinigt, 1:1 zusammengeführt und die Hybridisierung der an ihren 3'-Enden komplementären Einzelstränge herbeigeführt. In einer finalen Amplifikationsreaktion erfolgt schließlich die Elongation und Neusynthese dieser mutagenisierten Zielsequenz in Anwesenheit

des Primerpaares A1 / A2. Dies führt letztendlich zur gezielten Herstellung des gewünschten ST-Amplifikationsproduktes unter Berücksichtigung o.g. Regeln. In Abb. 2-2 sind die hierzu erforderlichen Einzelschritte des "Scramble-Priming" schematisch dargestellt.

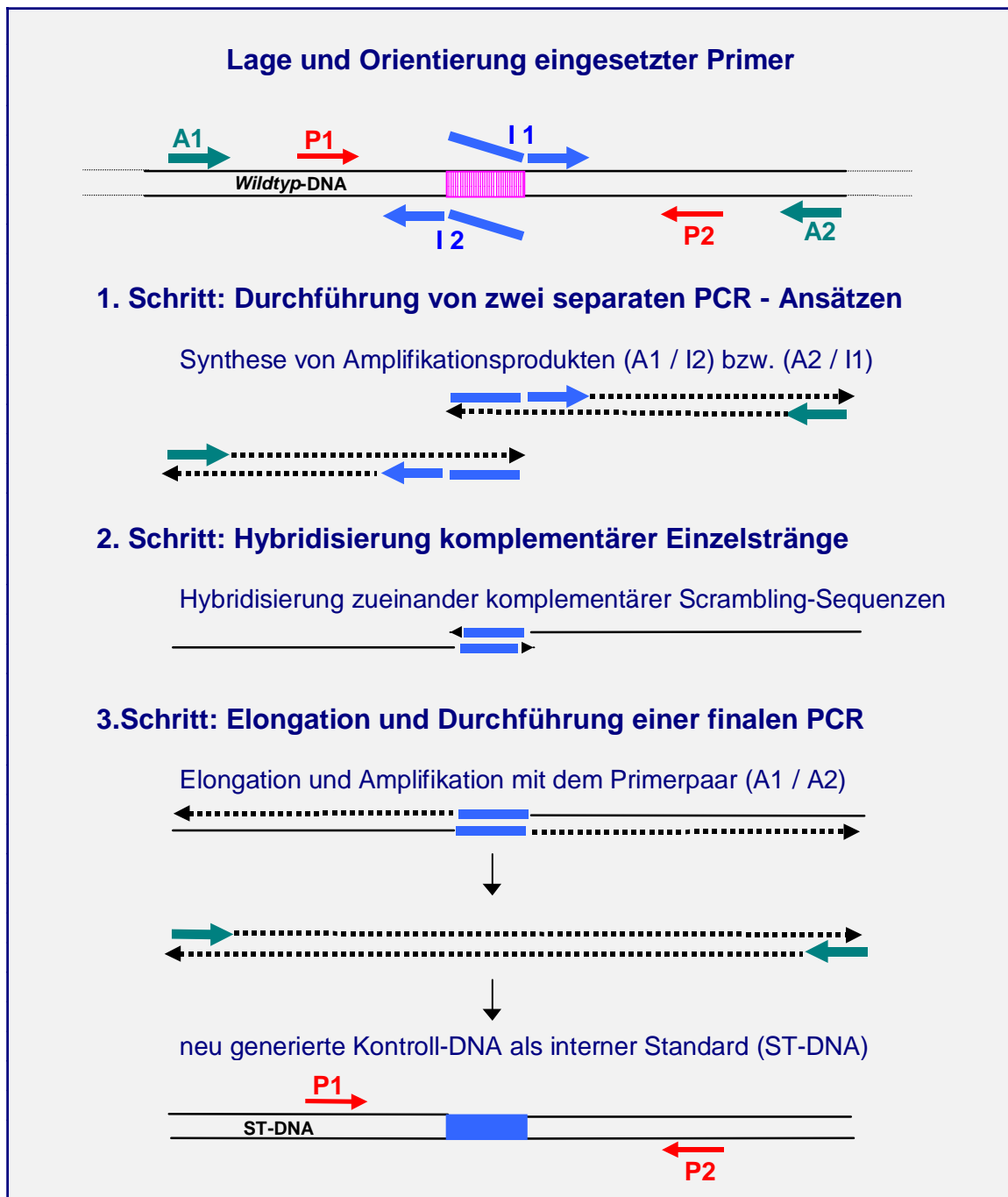


Abb. 2-2: Einzelschritte zur Herstellung von interner Kontroll-DNA durch *in vitro* Mutagenese mittels PCR

Außenprimer (A1 / A2); "Scrambling-Primer" (I1 / I2); PCR-Primer (P1 / P2); Die Pfeilrichtung der verwendeten Primer ist in 5' → 3'-Orientierung (Syntheserichtung) wiedergegeben. Elongationen und Neusynthesen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Lage der durch das Scrambling-Priming veränderten Sequenzen der Kontroll-DNA (ST-DNA) gegen über der ursprünglichen Sequenz der *Wildtyp*-DNA (WT-DNA) ist durch besondere Straffur hervorgehoben.

2.4.4 AUSWAHL EINES GEEIGNETEN DNA-NACHWEISVERFAHREN

2.4.4.1 *Visualisierung von PCR-Amplifikaten*

Eine Analyse von DNA-Fragmenten über Gelelektrophorese zeigt lediglich die Größe und Menge des gebildeten Amplifikates an, nicht aber die Sequenz („Identität“) des Amplifikationsproduktes. Eine Detektion von Krankheitserregern (DNA) über PCR und nachfolgender Visualisierung der PCR Produkte über Gelelektrophorese allein ist deshalb nicht ausreichend, da damit kein spezifischer Nachweis der Amplifikate durchgeführt wird. Abgesehen davon ist die Agarosegelelektrophorese problematisch, da das karzinogene und hochgiftige Ethidiumbromid zur Anfärbung der Amplifikate verwendet wird und dieses Verfahren nur schwer automatisierbar ist. Deshalb sollte für einen sicheren Nachweis von Krankheitserregern die Analyse und Identifikation der amplifizierten DNA (Spezifitätskontrolle) im Anschluß an die Amplifikation mittels PCR durchgeführt werden. Dazu stehen verschiedene spezifische DNA-Nachweisverfahren wie z.B. Southern Blot oder ELISA zur Verfügung.

2.4.4.2 *Spezifischer Nachweis von Amplifikationsprodukten*

Southern-Blot- oder Dot-Blot-Hybridisierung sind zeit- und arbeitsaufwendige Nachweismethoden für PCR Produkte (Landgraf *et al.*, 1991, Hahn *et al.*, 1995). Die nested PCR dient neben einer Steigerung der Sensitivität des Nachweises auch als Spezifitätskontrolle (Wahlberg *et al.*, 1990, Maass *et al.*, 1998). Als Routineverfahren für die Diagnostik von Krankheitserregern ist die nested PCR auf Grund ihrer Anfälligkeit für Kontaminationen ungeeignet (vgl. 2.4.2.1). Auch der für eine nested PCR notwendige Arbeitsaufwand spricht gegen eine routinemäßige Anwendung. In der klinischen Diagnostik weit verbreitet und anerkannt ist der ELISA. Viele Arbeitsgruppen berichten über den Nachweis von PCR Produkten nach dem Prinzip eines ELISA (Landgraf *et al.*, 1991, Friedhoff *et al.*, 1993, Hahn *et al.*, 1995, Gutierrez *et al.*, 1998). Der ELISA ist damit in den letzten Jahren zu der wohl wichtigsten immunochemischen Methode in der medizinischen Diagnostik und Lebensmittelanalytik avanciert. In ihm werden zwei wesentliche Testschritte in Kombination vereint, nämlich eine Substanz-spezifische Antigen-Antikörperreaktion gefolgt von seiner Visualisierung mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion.

Zum Nachweis der PCR Produkte nach dem Prinzip des ELISA wird das Amplifikat an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und so immobilisiert. Hierzu stehen verschiedene Bindungsarten zur Verfügung. Prinzipiell ist entweder eine Bindung des PCR Produktes selbst an die Mikrotiterplatte möglich, oder es hybridisiert mit einer Fangsonde, die an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden ist. Häufig wird die Affinität von Biotin zu Streptavidin für die Bindung der Amplifikate

an die Mikrotiterplatte genutzt. Zur Immobilisierung der DNA Fragmente kann eine mit Biotin markierte Fangsonde eingesetzt werden (Pinero *et al.*, 1999, Rahmah *et al.*, 1998, Gutierrez *et al.*, 1998, Whitby *et al.*, 1997, Psikal *et al.*, 1997, Lear *et al.*, 1995, Kessler *et al.*, 1994). Die Fangsonde ist an eine Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Das PCR Produkt hybridisiert mit der spezifischen Fangsonde, die komplementär zu einem Abschnitt der inneren Region des Amplifikats ist. Alternativ kann Amplifikat über Biotin markierte Primer an die Plattenoberfläche gebunden werden. In der Literatur wird vielfach ein mit Biotin markierter Primer in die PCR eingesetzt. Das biotinylierte Produkt bindet anschließend direkt an einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (Hahn *et al.*, 1995, Landgraf *et al.*, 1991, Keller *et al.*, 1991, Syvanen *et al.*, 1988). Bei dieser Art der Immobilisierung des PCR Produktes konkurrieren nicht verbrauchte mit Biotin markierte Primer aus dem PCR Ansatz mit den biotinylierten Amplifikaten um die Bindungsstellen. Die Bindungskapazität einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte ist nach Jonas *et al.* (1995) jedoch so hoch, dass auf eine Abtrennung überschüssiger Biotin markierter Primer verzichtet werden kann. Die Bindungskapazität der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte ist 50x höher als notwendig, um die maximale Menge an PCR Produkt zu binden (Kox *et al.*, 1996). Dennoch reinigen einige Arbeitsgruppen die Amplifikate vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte mittels diverser Kits (Lüneberg *et al.*, 1993, Koskiniemi *et al.*, 1997, Luk *et al.*, 1997). Eine andere Möglichkeit zur Verringerung der Konzentration an Biotin markiertem Primer ist eine Verdünnung der PCR Produkte (Niemeyer *et al.*, 1997). Neben Streptavidin eignet sich auch Avidin zur Beschichtung von Mikrotiterplatten (Landgraf *et al.*, 1991). Avidin weist einen isoelektrischen Punkt von ca. 10 auf, so dass es bei neutralem pH positiv geladen ist und unspezifisch mit negativ geladenen DNA-Molekülen reagieren kann (Ibelgaufts, 1993). Deshalb wird Streptavidin für das Arbeiten mit Nukleinsäuren bevorzugt (Buckland, 1986).

Neben der Möglichkeit DNA über Streptavidin-Biotin-Brücken zu immobilisieren, besteht die Möglichkeit die Amplifikate oder Fangsonden über kovalente Bindungen stabil an eine Mikrotiterplatte zu binden. Rasmussen *et al.* (1991) beschreibt die Ausbildung von kovalenten Phosphoramidbindungen zwischen auf einer Mikrotiterplatte immobilisierten sekundären Aminen mit 5'-Phosphat-Fangsonden. Nach diesem Verfahren binden Lage *et al.* (1996) und Cano *et al.* (1996) eine Sonde kovalent an eine Mikrotiterplatte.

Sonden dienen grundsätzlich als Spezifitätskontrolle. Durch die Hybridisierung des PCR Produktes an eine spezifische Fangsonde wird der Nachweis unspezifischer PCR Produkte stark vermindert (Kessler *et al.*, 1994, Lear *et al.*, 1995). Unspezifische Produkte sind z.B. Primerdimere oder Amplifikate, die sich von der nachzuweisenden Erreger-DNA-Fragment durch abweichende Sequenz oder Länge unterscheiden. Sie hybridisieren nicht mit der Sonde und werden aus der Vertiefung

der Mikrotiterplatte ausgewaschen. Generell kann man zwischen Fangsonde und Nachweissonde unterscheiden. Fangsonden sind wie bereits beschrieben entweder mit Biotin markiert und binden an eine mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte, oder sie tragen eine Phosphatgruppe am 5' Ende und bilden an einer mit sekundären Aminen beschichteten Mikrotiterplatte kovalente Phosphoamidbindungen aus. Sonden zum Nachweis von PCR Produkten tragen eine Markierung, mit der das Amplifikat nach Hybridisierung mit der Sonde nachgewiesen werden kann. Dabei kann die Nachweissonde selbst einen Farbstoff enthalten oder sie ist mit einem Enzym gekoppelt. Nachweissonden können auch mittels Biotin, Digoxigenin oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert werden. Cano *et al.* (1993) verwendet zur Immobilisierung des PCR-Produktes eine kovalent an die Mikrotiterplatte gebundene Fangsonde und setzt anschließend eine mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) markierte Nachweissonde ein. Lage *et al.* (1996) setzt eine kovalent gebundene Fangsonde und eine Biotin markierte Nachweissonde ein. Eine mit Digoxigenin markierte Nachweissonde wird von Lüneberg *et al.* (1993), Taniguchi *et al.* (1994) und Kox *et al.* (1996) verwendet. VanderBorgh *et al.* (1999) verwendet zur Detektion eine mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Oligonukleotidsonde.

Die Markierung der Sonden dient als Bindeglied und vermittelt entweder die Immobilisation des PCR Produktes oder den Nachweis nach dem Prinzip des ELISA. Es werden neben den Sonden auch PCR Produkte direkt markiert. Für die Markierung von Amplifikaten werden vielfach mit Biotin oder Digoxigenin markierte Primer eingesetzt, oder bei PCR Produkten werden im Verlauf der Amplifikation durch Inkorporation von markierten Desoxynukleosidtriphosphate (Digoxigenin-dUTP bzw. Biotin-dCTP) Markierungen eingefügt (Hahn *et al.*, 1995, Lear *et al.*, 1995; Ortiz, Ritter, 1996; Psikal *et al.*, 1997, VanderBorgh *et al.*, 1999).

Der Nachweis der markierten Sonden bzw. PCR Produkte erfolgt entweder mittels an Enzymen gekoppelten Antikörpern oder mit an Enzym gebundenem Streptavidin. Als Substrate für den Enzymumsatz kommen Fluoreszenzsubstrate, Chemilumineszenzsubstrate oder kolorimetrische 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. Als Farbsubstrat dient Tetramethylbenzidin. Kang *et al.* (1996), Pachner *et al.* (1996), Psikal *et al.* (1996) und Poggi Pollini (1997) weisen das mit Digoxigenin markierte PCR Produkt mit einem an das Enzym Peroxidase gekoppelten Antikörper nach. Als Substrat wird das Farbsubstrat ABTS (2,2-Azinbis-3-Ethylbenzothiazolin 6-Sulfonsäure) verwendet. Andere Arbeitsgruppen verwenden zum Nachweis einer Digoxigenin-Markierung einen mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten Antikörper und p-Nitrophenylphosphat als Farbsubstrat (Lear *et al.*, 1995, Vekris *et al.*, 1995, Luk *et al.*, 1997). Lüneberg *et al.* (1993) setzt ebenfalls einen mit

Alkalischer Phosphatase markierten Antikörper ein und setzt damit das Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylphosphat um. Ferner kann als Fluoreszenzsubstrat Atto PhosTM eingesetzt werden (Cano *et al.*, 1993). Niemeyer *et al.* (1997) zeigt durch einen Vergleich der AP Substrate Atto PhosTM und p-Nitrophenylphosphat, dass ein Nachweis mittels Fluoreszenzsubstrat 10fach sensitiver als der kolorimetrische Nachweis ist.

Zum Nachweis von Biotin markierten PCR Produkten oder an PCR Produkten hybridisierten Nachweissonden wird Streptavidin-POD verwendet (Lage *et al.*, 1996, Keller *et al.*, 1990).

Landgraf *et al.* (1991) verwendet zum Nachweis der PCR Produkte einen mit POD markierten gegen Fluoresceinthiocyanat gerichteten Antikörper zusammen mit dem Farbsubstrat Tetramethylbenzidin. Ferner wird zum Nachweis von Fluoresceinthiocyanat ein mit AP markierter Antikörper und als Substrat p-Nitrophenylphosphat eingesetzt (Lear *et al.*, 1995).

2.4.5 NUKLEINSÄURESONDEN

Der Einsatz von DNA-Nachweissonden im PCR-ELISA beruht auf dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung, d.h. der spezifischen Ausbildung von DNA-DNA-Doppelsträngen aus einzelsträngigen, einander komplementären Nukleinsäuremolekülen (Ibelgauf, 1993). Man benötigt zum Nachweis von Erreger spezifischen Amplifikaten DNA-Nachweissonden, deren Basensequenz mit einem Teil des gesuchten DNA-Bereiches identisch ist. Für das Design der Nachweissonden gelten äquivalent dem Primerdesign die folgenden Grundsätze. In der Regel sind DNA-Nachweissonden Oligonukleotide bestehend aus 15 bis 30 Nukleotiden, die eine möglichst zufällige Basenverteilung haben. Dabei sollte die Basenzusammensetzung ähnlich der des nachzuweisenden DNA-Fragments sein. Eine Nachweissonde sollte weder inter- noch intramolekular komplementär sein. Andernfalls können sich Sekundärstrukturen ausbilden, die die Nachweiseffizienz des ELISA negativ beeinflussen. Verschiedene Faktoren wie DNA-Konzentration, Länge der hybridisierenden Stränge, Ionenstärke der Lösung sowie die Temperatur beeinflussen das Hybridisierungsverhalten (Roloff, 1997).

2.4.6 FESTLEGUNG VON NACHWEISGRENZEN („CUT-OFF“)

Der sog. „cut-off“ stellt die Grenze zwischen positiven und negativen Ergebnissen einer Messung dar. Er wird unterschiedlich definiert. Die Festlegung eines „cut-off“ hängt von der Höhe der Meßwerte der verwendeten Negativkontrollen ab. Schwanken diese Werte stark um ihren Mittelwert, so muß zur Vermeidung falsch

positiver Ergebnisse einer Diagnose diese mögliche Schwankung bei der Festlegung der Nachweisgrenze berücksichtigt werden. Zur Festlegung des „cut-offs“ wird der Mittelwert der durchgeführten Negativkontrollen und die zugehörige Standardabweichung bestimmt. Daraus wird von einigen Arbeitsgruppen als Nachweisgrenze der Wert aus Mittelwert zuzüglich der 3fachen Standardabweichung (σ) festgelegt (Lüneberg *et al.*, 1993, Lage *et al.*, 1996, Pachner *et al.*, 1996). Dabei variiert die Anzahl und Art der Negativkontrollen. So werden beispielsweise Kontrollen mit Wasser oder DNA (negatives Probenmaterial) verwendet. Andere legen als Nachweisgrenze Werte fest, die keinem mathematischen Zusammenhang aus Mittelwert und Standardabweichung der Negativkontrollen folgen (Keller *et al.*, 1990).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 REAGENZIEN

Zur Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades p.a. verwendet. Diese wurden von den Firmen Roche¹, Sigma Aldrich², Life Technologies³, Merck⁴ und bezogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang beschrieben.

3.1.2 NÄHRMEDIEN

Zur Anzucht der in Tabelle 3-4 aufgelisteten nicht pathogenen Mikroorganismen wurden die von der jeweiligen Stammsammlung empfohlenen Nährmedien verwendet. Bei der Herstellung der Medien sowie der Anzucht der Mikroorganismen wurde ich freundlicherweise von der Abteilung Mikrobiologie der BioteCon GmbH durch Astrid Seemann und ihre Mitarbeiterinnen unterstützt.

3.1.3 STERILISATION VON MATERIALIEN

Hitzestabile Lösungen und Labormaterialien wurden 20 min bei 1,2 bar und 121 °C auto-klaviert. Hitzelabile Lösungen wurden über Membranfilter (0,2 µm) sterilfiltriert.

3.1.4 REAKTIONSKITS

QIAquickTM Gel Extraktion Kit (QIAGEN⁵ Kat. Nr. 28704)

QIAquickTM PCR Purifikation Kit (QIAGEN⁵ Kat. Nr. 28104)

High Pure PCR Template Prep. Kit (Roche¹ Kat. Nr. 1796828)

Sequitherm ExcelTM II DNA Sequencing Kit LC (Biozym⁶ Kat. Nr. 104815)

¹ F. Hoffmann-La Roche AG / Ch-Basel (Boehringer Mannheim, D-Mannheim); www.roche.com/diagnostics/

² Sigma-Aldrich Chemie GmbH / D-82024 Taufkirchen (Sigma, Aldrich, Fluka); www.sigma-aldrich.com

³ Life Technologies GmbH (Gibco BRL) / D-76131 Karlsruhe; www.lifetech.com

⁴ Merck KGaA / D-64293 Darmstadt; www.merck.de/german/index.htm

⁵ Qiagen / D-Hilden; www.qiagen.com/

⁶ Biozym Diagnostik GmbH / D-31833 Hess.Oldendorf; www.biozym.com

3.1.5 SOFTWARE

Microsoft® Word 97 SR-2	Textverarbeitung (Microsoft Corporation ⁷)
Microsoft® Excel 97 SR-2	Tabellenkalkulation (Microsoft Corporation ⁷)
Reference Manager 8.5	Literaturdatenbank (Research Information Systems ⁸)
Easy Win 32	Bildbearbeitung (Herolab ⁹)
Microsoft® Photo Editor 3.0	Bildbearbeitung (Microsoft Corporation ⁷)
DNASTAR® Version 4.0 für Windows	Sequenzanalyse (Lasergene ¹⁰)
BaselmgIR® Version 4.0	Sequenzanalyse (LI-COR ¹¹)
OLIGO-Applet [©]	Oligonukleotidanalyse (TIB Molbiol Berlin ¹²)
SOFTmax Version 2.34	Datenerfassung ELISA (Molecular Devices ¹³)

⁷ www.microsoft.com/germany/

⁸ www.risinc.com/

⁹ www.herolab.de/

¹⁰ www.dnastar.com/

¹¹ www.licor.com/

¹² www.lynet.de/TIB-MOLBIOL/oligo_ag.html

¹³ www.moldev.com/

3.1.6 DNA AUS MIKROORGANISMEN

Die Zugehörigkeit der *Coxiellen*, *Francisellen* und Orthopockenviren zur Risikogruppe 3 läßt in den verfügbaren Laboratorien nur das Arbeiten mit inaktivierten Biomaterialien (beispielsweise durch Hitze) zu. Der Einsatz vitaler / infektiöser Agenzien war auch auf Grund von Sicherheitsaspekten in der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen. Als Ausgangsmaterialien wurden nur inaktivierte Biomaterialien zur Gewinnung geeigneter Erreger-DNA bzw. bereits verfügbare DNA-Extrakte zum Einsatz in die PCR verwendet. Es wurden daher keine mikrobiologischen Arbeiten mit den nachzuweisenden Erregern durchgeführt.

Tabelle 3-1: *Coxiella burnetii* Isolate

Spezies	Kürzel/ Not-I- Gruppe*	Wirts- species	Stamm	Herkunft	Quelle
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb1 / Gr. I	Zecke	Nine Mile RSA 493	USA	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb2 / Gr. IV	Ziege	Priscilla Q 177	USA	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb3 / Gr. V	Mensch	Scurry Q 217	USA	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb4 / Gr. VI	Nagetier	Dugway 5J108-111	USA	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb5 / Gr. 16	Mensch	Butin	Frankreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Cb6 / Gr. 10	Mensch	R 1140	Rußland	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 1	Zecke	CS Ixodes	Rußland	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 2		CS Z 57	Slowakei	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 3	Mensch	CS R	Italien	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 6	Ziege	Z 2534	Österreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 7	Rind	Z 2775	Deutschland	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 8	Mensch	Brasov	Rumänien	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 9	Ziege	Namibia	Namibia	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 11	Mensch	Schperling	Kirgisien	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 12	Mensch	F 1	Frankreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 13	Mensch	F 7	Frankreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 14	Mensch	F 8	Frankreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 15	Mensch	F 9	Frankreich	IHIT
<i>Coxiella burnetii</i>	Gr. 16	Mensch	F 2	Frankreich	IHIT

* (vgl. Jäger *et al.* 1998)

Alle 19 Isolate der Spezies *Coxiella burnetii* wurden freundlicherweise von Dr. C. Jäger und Dr. H. Willems aus Gießen (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere; IHIT) als inaktiviertes Zellmaterial zur Verfügung gestellt.

Die 15 DNA-Isolate der Gattung *Francisella* wurden ebenfalls als inaktiviertes Zellmaterial von Herrn PD. Dr. Meyer (Institut für Mikrobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München; WIS-M) sowie von Frau Dr. Niederwörmeier zur Verfügung gestellt (Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien, Munster; WIS-MU).

Tabelle 3-2: *Francisella* spp. Isolate

Spezies	Kürzel	biovar	Stamm/ Isolat	Herkunft	Quelle
<i>F. tularensis</i>	F3	B	FML83993/84	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F4	B	Hare88	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F5	B	FML3207/84	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F6	B	NO/9/15/51	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F9	B	FML425FRA	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F16	B	FOA1	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F18	B	Sv121	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F20	B	Sv221	Oslo 8/95	WIS-M
<i>F. novicida</i>	F223	-		WIS-MU	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	F396	A		WIS-MU	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	St202	A		WIS-MU	WIS-M
<i>F. tularensis</i>	LVS	B			WIS-M
<i>F. tularensis</i>	140	A	ATCC 6223	ATCC	WIS-MU
<i>F. novicida</i>	223	-	ATCC 15482	ATCC	WIS-MU
<i>F. philomiragia</i>	-	-	DSM 7535	DSM	DSM

Die 8 Isolate der Gattung Orthopockenviren wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. Meyer (München; WIS-M) in Form von DNA-Material zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-3: Orthopockenviren Isolate

Spezies	Kürzel	Stamm/ Isolat	Quelle
buffalopox	OP1	BP-1	WIS-M
camelpox	OP2	CP-1	WIS-M
cowpox Brighton	OP3	Cowpox BR	WIS-M
elefantpox	OP4	EP-1	WIS-M
rabbitpox	OP5	RPV	WIS-M
mousepox	OP6	MP-1	WIS-M
vaccinia elstree B5	OP7	Vacc Elstree	WIS-M
Racoonpoxvirus	OP8		WIS-M

Zur Abgrenzung phylogenetisch nahe verwandter Spezies sowie zur weiteren Überprüfung der Spezifität der PCR-Systeme wurden sowohl DNA-Extrakte aus weiteren Gram-negativen und -positiven Bakterien als auch DNA aus Viren, Pilzen, Tieren und humanen Zellen eingesetzt und getestet (Tabelle 3-4). Diese Mikroorganismen wurden über die Stammsammlung ATCC und DSM bezogen. Weitere Mikroorganismen stammen aus der BioteCon Stammsammlung und aus der Sammlung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Berlin bzw. Wernigerode, BGVV).

Tabelle 3-4: Liste weiterer verwendeter DNA-Quellen

	Spezies	Stamm-Nr.	Quelle
Gram-negative Bakterien	<i>Acinetobacter spp.</i>	DSM 590	DSM
	<i>Brucella melitensis</i>	BGVV 18	BGVV
	<i>Campylobacter fetus</i>	DSM 5361	DSM
	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	DSM
	<i>Cycloclasticus pugetii</i>	ATCC 51542	ATCC
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	2151	BioteCon
	<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	DSM
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	674	BioteCon
	<i>Erwinia carotovora</i>	DSM 30168	DSM
	<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	DSM
	<i>Hafnia alvei</i>	1267	BioteCon
	<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM 4690	DSM
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13313	ATCC
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175	DSM
	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33153	ATCC
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143	DSM
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	2891	BioteCon
	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	ATCC VR 1361	ATCC
	<i>Providencia stuartii</i>	DSM 4539	DSM
	<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	DSM
	<i>Proteus morgani</i>	DSM 5360	DSM
	<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 2140	DSM
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 21472	ATCC
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4882	BioteCon
	<i>Salmonella typhimurinum</i>	2157	BioteCon
	<i>Serratia marcescens</i>	677	BioteCon
<i>Shigella boydii</i>	DSM 7532	DSM	

Tabelle 3-4: Fortsetzung

	Spezies	Stamm-Nr.	Quelle
	<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	DSM
	<i>Thiomicrospira pelophila</i>	DSM 1534	DSM
	<i>Wolbachia persica</i>	ATCC VR 331	ATCC
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4782	DSM
Gram-positive Bakterien	<i>Actinomyces bovis</i>	DSM 43014	DSM
	<i>Arthrobacter simplex</i>	ATCC 6946	ATCC
	<i>Arthrobacter spp.</i>	DSM 312	DSM
	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 31	DSM
	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 8970	DSM
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ATCC 10132	ATCC
	<i>Clostridium bifermentans</i>	DSM 630	DSM
	<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756	DSM
	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 6134	DSM
	<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 0301	BioteCon
	<i>Listeria monocytogenes</i>	SLCC 53	BioteCon
	<i>Micrococcus citreus</i>	2147	BioteCon
	<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348	DSM
	<i>Rhodococcus equi</i>	4920	BioteCon
	<i>Rhodococcus spp.</i>	DSM 6377	DSM
	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	DSM
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5553	BioteCon
	<i>Staph. epidermidis</i>	ATCC 12228	ATCC
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 20259	BioteCon
	<i>Streptomyces griseus</i>	2156	BioteCon
Hefe	<i>Candida albicans</i>	DSM 1386	DSM
Viren	HSV 2	-	BioteCon
Tiere	Fisch	-	BioteCon
	Fleisch	-	BioteCon
Mensch	Humane Zelllinie	DSMZ U-266	DSMZ

3.1.7 DNA-PRÄPARATION

Zur Isolierung von DNA werden die Zellen (tote Zellen oder 1,5 ml Flüssigkultur) durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge¹⁴ für 10 min bei 10.000 x g sedimentiert. Je nach benötigtem Reinheitsgrad der zu präparierenden DNA werden verschiedene Aufreinigungsverfahren angewendet.

3.1.7.1 Alkalische Lyse

Das Zellsediment wird in 1x PBS (Angang) gewaschen und erneut für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird je nach Größe in 100 - 400 µl 50 mM Natriumhydroxidlösung resuspendiert und für 10 min bei 95 °C im Thermoblock inkubiert. Der Ansatz wird mit 4 µl 1 M Tris (pH 8,0) je 25 µl eingesetzter NaOH-Lösung neutralisiert. Die Präparation wird direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.1.7.2 DNA-Extraktion nach enzymatischem Zellaufschluß

Die sedimentierten Zellen werden mit 1 ml 1x PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Zellyse wird nach Zugabe von 15 µl Lysozym (10 mg/ml in Tris-HCl, pH 8,0) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 200 µl Bindungspuffer¹⁵ erfolgt der RNA-Verdau bei 37 °C für 10 min mittels RNase (10 mg/ml). Die freigesetzten Proteine werden bei der folgenden Inkubation mit Proteinase K (20 mg/ml) für 10 min bei 72 °C hydrolysiert.

Anschließend wird die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kit¹⁵ entsprechend den Herstellerangaben extrahiert und bei -20 °C gelagert.

3.1.8 ERMITTLUNG DER DNA-KONZENTRATION UND -REINHEIT

Die optische Dichte einer DNA-Lösung ist ein Maß für die Konzentration und Reinheit von DNA. Photometrisch¹⁶ werden die Absorptionswerte der in TE-Puffer gelösten DNA bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. DNA wird als hochrein erachtet, wenn der Quotient $OD_{230\text{ nm}}/OD_{260\text{ nm}}$ bei 0,45 und $OD_{280\text{ nm}}/OD_{260\text{ nm}}$ bei 0,55 liegt.

Ein höherer Quotient deutet bei $OD_{230\text{ nm}}/OD_{260\text{ nm}}$ auf Polysaccharidverunreinigungen hin, bei $OD_{280\text{ nm}}/OD_{260\text{ nm}}$ auf Reste von Proteinen

¹⁴ Eppendorf Modell 5415C; Eppendorf AG / D-22339 Hamburg; www.eppendorf.com/

¹⁵ High Pure PCR Template Prep. Kit, Kat. Nr. 1796828, F. Hoffmann-La Roche AG / Ch-Basel; www.roche.com/diagnostics/

¹⁶ Gene Quant II, Pharmacia; Pharmacia & Upjohn GmbH / D-91058 Erlangen; www.pharmacia.de/

oder Phenol (Marmur *et al.* 1961; Müller *et al.* 1993). Nach Sambrook *et al.* (1989) ist der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ein Kriterium für die Verunreinigung durch Proteine, für reine DNA sollte er im Bereich von 1,8 – 1,9 liegen.

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm:

$$1 \text{ OD}_{260\text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g DNA/ml}$$

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt auch über den Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten im Agarosegel. Zum Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten wurden als Mengenstandards die auch für die Bestimmung des Molekulargewichtes verwendeten DNA-Molekulargewichtsmarker der Firma Roche eingesetzt (Kap. 3.1.11). Dazu wurde die Intensität der Probenbande ins Verhältnis zur Intensität und DNA-Konzentration einer vergleichbaren Markerbande gesetzt. Diese Methode lässt allerdings nur eine relativ grobe Abschätzung der DNA-Konzentration zu, da die eingesetzten Marker nicht für Konzentrationsbestimmungen kalibriert sind.

3.1.9 PCR-VERFAHREN UND REAKTIONSANSATZ

Die PCR ist ein geeignetes *in vitro* Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz. In dieser Arbeit wurde die PCR zur gezielten Amplifizierung von DNA-Fragmenten der nachzuweisenden Erreger (Zielorganismus) sowie zur *in vitro* Mutagenese eingesetzt. Die Reaktion wird in 25 µl Ansätzen in 0,2 ml PCR 8 Strip Tubes¹⁷ nach dem in Abb. 3-1 dargestellten Grundschemata in einem Perkin Elmer Thermocycler 9600 bzw. 9700 durchgeführt.

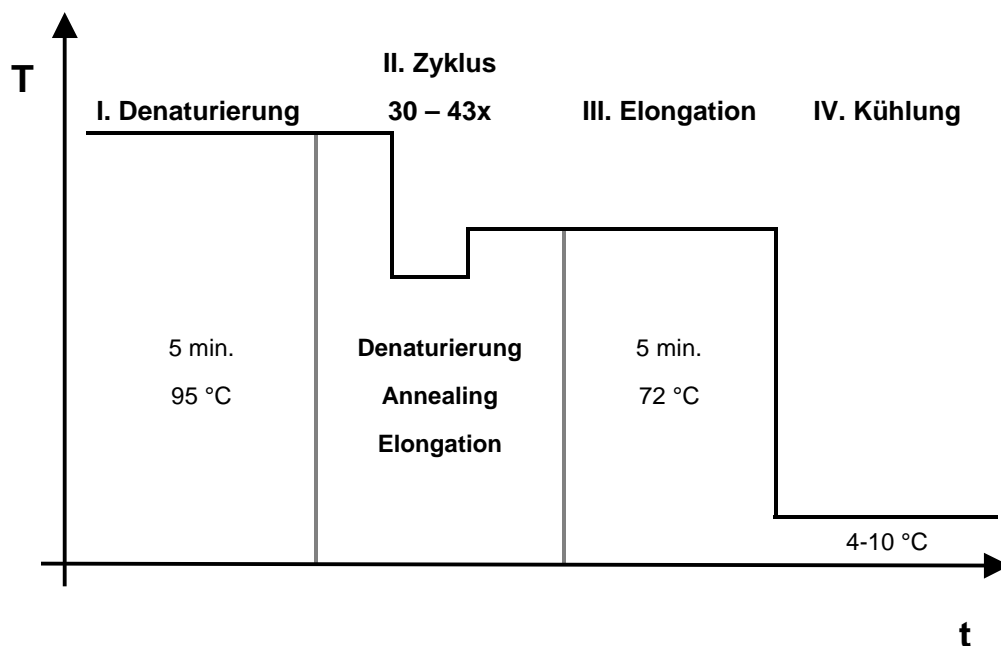


Abb. 3-1: Grundschemata einer zur Amplifizierung durchgeführten PCR

Die DNA Gewinnung, die Durchführung der PCR und der Nachweis der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese oder PCR-ELISA werden in 4 getrennten Räumen durchgeführt. Der PCR-Prämix wird unter Verwendung von sterilen Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen hergestellt und aliquotiert. Als PCR Wasser wird Aqua ad iniectionem¹⁸ genutzt. Für die Zugabe von DNA bzw. Zellextrakt zu den Reaktionsansätzen werden gestopfte Pipettenspitzen¹⁹ verwendet. Als Negativ-Kontrolle wird, wenn nicht anders beschrieben, ein Ansatz ohne DNA-Matrize mitgeführt. Die Schmelztemperatur (T_m) und eine davon abgeleitete geeignete Annealingtemperatur für die eingesetzten Primer (Kap. 3.1.10, 3.1.12, 3.1.13 bzw. 3.1.14) wird mittels OLIGO-Applet²⁰ bestimmt.

¹⁷ Eppendorf Kat. Nr. 0030124227; Eppendorf AG / D-22339 Hamburg; www.eppendorf.com/

¹⁸ B.Braun Melsungen AG / D-34212 Melsungen; www.bbraun.com/

¹⁹ Art 20 E bzw. 100 Tips, Kat. Nr. 14862-023 und 14865-018; Life Technologies GmbH / D-76131 Karlsruhe; www.lifetech.com

²⁰ TIB Molbiol / D-10829 Berlin; www.lynet.de/TIB-MOLBIOL/oligo_ag.html

Reaktionsansatz:

Sämtliche Pipettierschritte erfolgen stets auf Eis in alphabetischer Reihenfolge (vgl. Tabelle 3-5). In Abhängigkeit der durchzuführenden PCR-Reaktion enthält der jeweilige Ansatz nur bestimmte Komponenten (siehe Tabelle 3-6). Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes beträgt immer 25 µl, fehlende Volumina werden durch Zusatz von H₂O auf 25 µl finales Reaktionsvolumen entsprechend kompensiert.

Tabelle 3-5: Komponenten eines PCR Reaktionsansatzes

Komponenten		Konzentration
A	H ₂ O	-
B	PCR-Puffer	10x-Konz.
C	MgCl ₂	50 mM
D	dUTP (dTTP) -Mix	je 10 mM
E	Primer	10 pmol/µl
F	Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl
G	ST-DNA als Amplifikationskontrolle	var.
H	DNA-Extrakt/-Eluat der Probe	var.
I	WT-DNA als Positivkontrolle	10 -100 pg/µl
J*	Uracil-N-Glycosylase (UNG)	0,15 U

* vgl. auch Kapitel 3.1.18: Einfluß von UNG auf die Sensitivität des PCR-ELISA

Tabelle 3-6: Zusammensetzung verschiedener PCR-Reaktionen

PCR-Ansatz		Komponenten	
Untersuchungsmaterialien	DNA-Extrakt/-Eluat der Probe	A-H	(+J*)
Kontrollreaktionen	Wildtyp-Positivkontrolle	A-G und I	(+J*)
	Standardkontrolle	A-G	(+J*)
	Negativkontrolle	A-F	(+J*)

*Dekontaminationsschritt ist optional

Unmittelbar nach dem Ansatz der PCR-Reaktion erfolgt die Amplifikation in einem Thermocycler (Perkin Elmer²¹, Modell Gene Amp 9600 bzw. 9700) mit einem definierten Thermoprofil (vgl. Kap. 3.1.10, 3.1.12, 3.1.13 bzw. 3.1.14).

²¹ <http://instruments.perkinelmer.com/index.asp>

Für die PCR wird die bio-*Taq*-DNA-Polymerase²² mit dem zugehörigen Puffer²³ und einer 50 mM Magnesiumchlorid Lösung verwendet. Die Nukleotide²⁴ werden von der Firma Roche²⁵ bezogen. In den meisten Fällen wird im Nukleotidgemisch dTTP durch dUTP ersetzt. Es wird die UNG von Life Technologies²⁶ verwendet.

Die verschiedenen markierten (5'-Biotin bzw. -Digoxigenin) und unmarkierten Oligonukleotide werden von der Firma INTERACTIVA²⁷ synthetisiert. Die Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide sind in den jeweiligen Kapiteln der einzelnen Nachweissysteme (vgl. Kap. 3.1.10, 3.1.12, 3.1.13 bzw. 3.1.14) dargestellt.

²² Biomaster GmbH / D-51109 Köln, Kat. Nr. 01001-05

²³ [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % Tween® 20]

²⁴ dATP Kat. Nr. 1889516, dCTP Kat. Nr. 1889508, dGTP Kat. Nr. 1889524, dTTP Kat. Nr. 1889559, dUTP Kat. Nr. 1889532

²⁵ F. Hoffmann-La Roche AG / Ch-Basel (Boehringer Mannheim, D-Mannheim); www.roche.com/diagnostics/

²⁶ Life Technologies Kat. Nr. 18054-015; Life Technologies GmbH / D-76131Karlsruhe; www.lifetech.com

²⁷ INTERACTIVA The Virtual Laboratory / D-89077 Ulm; www.interactiva.de/

3.1.10 ÜBERPRÜFUNG DER AMPLIFIZIERBARKEIT VON DNA

In Tabelle 3-7 sind die zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der präparierten DNA verwendeten allgemeinen Primer (Barry *et al.* 1990) dargestellt.

Tabelle 3-7: Oligonukleotide für den allgemeinen DNA-Nachweis

Bezeichnung	GC (%)	T _m (°C)	Sequenz
41F	60	62,5	GCTCAGATTGAACGCTGGCG
1066R	45	54,0	ACATTTCACAAACACGAGCTG

Alle in dieser und den nachfolgenden Tabellen angegebenen Schmelztemperaturen (T_m) wurden mittels OLIGO-Applet^{© 28} berechnet.

3.1.10.1 PCR-Protokoll

Folgende Komponenten werden zum Ansetzen der PCR-Reaktion benötigt (vgl. Tabelle 3-5):

Tabelle 3-8: Komponenten des Reaktionsansatzes zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Komponenten	Volumen [µl]
A	ad 25
B	2,5
C	1,0
D	0,5
E	je 1,5
F	0,25
G	-
H	1,0
I	1,0

Unter Verwendung der Primer-Kombination 41F/1066R wird das folgende Thermoprofil verwendet. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 1025 bp.

²⁸ TIB Molbiol / D-10829 Berlin; www.lynet.de/TIB-MOLBIOL/oligo_ag.html

Tabelle 3-9: Temperatur-Zeit-Profil der PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	5 - 10 min	95 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	30 sec	94 °C
Anlagerung	30 sec	58 °C
Synthese	1,5 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

3.1.11 AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Die Trennung von DNA-Fragmenten (dsDNA) erfolgt nach ihrem Molekulargewicht mittels horizontaler Flachgel-Elektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989), die zur Visualisierung und Reinigung eingesetzt wird. Je nach zu erwartender Größe des zu trennenden DNA-Fragmentes wird die Konzentration der Agarose²⁹ zwischen 1 und 2 % variiert und mit 0,05 µl/ml Ethidiumbromid versetzt. Das in die dsDNA interkalierende Ethidiumbromid macht eine spätere Visualisierung durch UV-Licht möglich. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 5 -15 V/cm in einem TBE-Puffersystem (Anhang). Dazu wurde die Probe mit ca. 1/10 (v/v) Ladepuffer (Anhang) versetzt. Die ethidiumbromidgefärbten Banden werden mittels UV-Licht ($\lambda=312$ nm) in einem Gel-Dokumentationsgerät der Firma Herolab visualisiert, photographiert und ggf. quantitativ ausgewertet. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. der Anzahl der Basenpaare linearer, doppelsträngiger DNA werden die DNA-Molekulargewichtsmarker VI und X (vgl. Abb. 3-2) der Firma Roche³⁰ eingesetzt.

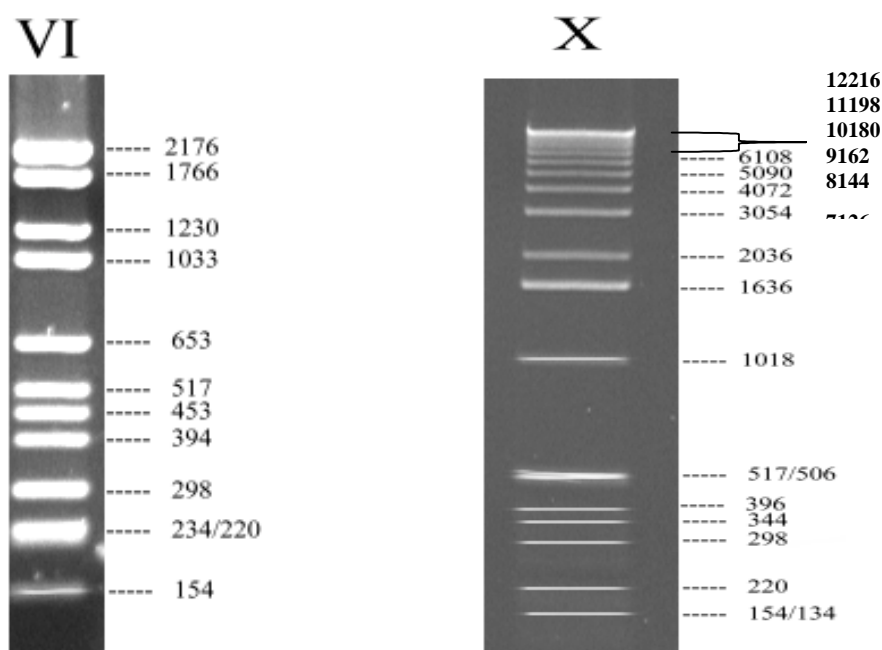


Abb. 3-2: Verwendete DNA-Molekulargewichtsmarker

²⁹ Biozym Kat. Nr. 870055; Biozym Diagnostik GmbH / D-31833 Hess.Oldendorf; www.biozym.com

³⁰ Roche Kat. Nr. 1062590 bzw. 1498037; F. Hoffmann-La Roche AG / Ch-Basel; www.roche.com/diagnostics/

Im Fall einer präparativen Gelelektrophorese werden PCR-Produkte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm ausgeschnitten und wie unter Kap. 3.1.16.1A beschrieben gereinigt.

Zur Überprüfung der Qualität genomischer DNA bzw. von Zellextrakten wird eine Probe auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. DNA ist bei mechanischer oder enzymatischer Zerstörung nicht mehr als deutlich abgegrenzte Bande im Gel sichtbar. Verunreinigungen durch Ribonukleinsäuren sind im Agarosegel als „Wolke“ nah der Lauffront zu erkennen.

3.1.12 COXIELLA BURNETII NACHWEISSYSTEM

Zur Etablierung des Nachweises von *Coxiella burnetii* mittels PCR-ELISA wird ein Primersystem von Willems *et al.* (1994) verwendet. Grundlage dieses Systems ist die von Hoover *et al.* (1992) beschriebene Insertionssequenz *IS1111a* mit Transposaseaktivität, die in bis zu 19 Kopien im Genom von *Coxiella burnetii* vorkommen soll. Willems *et al.* verwendete aus dieser Genregion einen 678 bp Sequenzabschnitt für den PCR-Nachweis mit der Primerkombination Trans1/Trans2.

3.1.12.1 Oligonukleotide

Neben den Amplifikationsprimern Trans1/Trans2 kommen zur Etablierung des PCR-ELISA Nachweissystems für *C. burnetii* eine Reihe weiterer Oligonukleotide zum Einsatz. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 3-10: Oligonukleotide für das *C. burnetii* Nachweissystem

Bezeichnung	GC (%)	T _m (°C)	Markierung	Sequenz
<i>PCR Primer</i>				
Trans1	55,0	54,9	-	5'- TATGTATCCACCGTAGCCAGTC -3'
Trans2	47,6	54,9	5'-Dig	5'- CCCAACAAACACCTCCTTATTC -3'
<i>Scramble Primer</i>				
SCR-Cb-3	56,1	80,3	-	5'-GACTACGGAATTCCGCTGTC- -CCGGGGGTGGGTTATTTAACG -3'
SCR-Cb-4	48,7	76,4	-	5'-GACAGCGGAATTCCGTAGTC- -AATCCTCATTGGCTTTTGC -3'
A-Cb-1	45,2	73,4	-	5'-CAACTGTGTGGAATTGATGAGTGGGG- -TAAAGTGATCTACACG -3'
A-Cb-2	52,5	78,2	-	5'-CATCAGCCCTCATTGTTTCGAACTCGG- -TTGGTGTGTCTCC-3'
<i>Sonden</i>				
Cb-2 (WT)	55,0	54,4	5'-Biotin	5'- GTCAACGGGTACAGAGCATC -3'
STp12/19	55,0	55,7	5'-Biotin	5'- GACTACGGAATTCCGCTGTC -3'

3.1.12.2 PCR-Protokoll

Folgende Komponenten werden zum Ansetzen der optimierten *C. burnetii* PCR-Reaktion benötigt (vgl. Tabelle 3-5):

Tabelle 3-11: Komponenten des *Coxiella*-PCR Reaktionsansatzes

Komponenten	Volumen [µl]
A	ad 25
B	2,5
C	1,0
D	0,5
E	je 2,5
F	0,2
G	1,0
H	1,0
I	1,0
J	0,15

Unter Verwendung der Primer-Kombination Trans1/Trans2-Dig hat sich für die Durchführung der PCR Reaktion das folgende Thermoprofil bewährt. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 678 bp.

Tabelle 3-12: Temperatur-Zeit-Profil der *C. burnetii* PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
Dekontamination <small>(optional)</small>	30 min	37 °C
initiale Denaturierung	5 - 10 min	95 °C
"touchdown": minus 2 °C in fünf Schritten		
Denaturierung	15 sec	94 °C
Anlagerung	30 sec	75 °C - 67 °C
Synthese	1 min	72 °C
38-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	15 sec	94 °C
Anlagerung	30 sec	65 °C
Synthese	1 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

3.1.13 FRANCISELLA TULARENSIS NACHWEISSYSTEM

Zur Etablierung des Nachweises von *Francisella tularensis* kommt das PCR-System von Long *et al.* (1993) zur Anwendung. Es basiert auf Sequenzen des Membranproteins *TUL4* (Sjostedt *et al.* 1990). Mit der Primerkombination Ft393/Ft642 liegt die erwartete Größe der Amplifikate bei 250 bp. Ferner werden die von Junhui *et al.* (1996) und Fulop *et al.* (1996) entwickelten Primersysteme getestet (Kap. 3.1.13.3 bzw. 3.1.13.4).

3.1.13.1 Oligonukleotide

Tabelle 3-13: Oligonukleotide für das *F. tularensis* Nachweissystem

Bezeichnung	GC (%)	T _m (°C)	Markierung	Sequenz
<u>PCR Primer</u>				
FT393	50,0	55,1	-	5'- ATGGCGAGTGATACTGCTTG -3'
FT642	50,0	54,1	5'-Dig	5'- GCATCATCAGAGCCACCTAA -3'
P1	52,6	54,6	-	5'- TGGCGAGTGATACTGCTTG -3'
P2	48,1	61,5	-	5'- TAGGATCCCATTAGCTGTCCACTTACC -3'
P3	46,2	62,0	-	5'- GGAATTCGTTAGGTGGCTCTGATGAT -3'
P4	47,4	55,0	-	5'- CGCTAAACCTGCGATTGAT -3'
FNA8L	40,0	61,1	-	5'- CACCATTATCCTGGATATTACCAGTGTCAT -3'
FNB8L	48,1	61,5	-	5'- TAGGATCCCATTAGCTGTCCACTTACC -3'
FNA7L	41,9	64,5	-	5'- CTTGAGTCTTATGTTTCGGGCATGTGAATAG-3'
FNB1L	41,9	64,1	-	5'- CCAACTAATTGGTTGTACTGTTACAGCGAAG-3'
<u>Scramble Primer</u>				
SCR-FT-1	15,7	63,7	-	5'- TTTTTATCAAGACAATTAATTTAAG- -TATCTATATGAAAAAATAATTAAGC-3'
SCR-FT-2	19,1	62,6	-	5'- CTTAAATTAATTGTCTTGATAAAAA- -ATATACTCAAATCGATTATAAC -3'
A-FT-1	17,5	58,4	-	5'- GTTAATAAGTTATAATCTTATATATAGTTAACT- -ATGTTATTATAATCAAGG-3'
A-FT-2	17,6	64,2	-	5'-CTAGAAAATTATAAATATTTGAAGAAATTAAT- -ATTTATTGAATCAGAAGC-3'
<u>Sonden</u>				
Ft-1-Bio (WT)	23,8	42,1	5'-Biotin	5'- GTGAATATTTAAAAATAGGAG -3'
ST-Ft-1-Bio	16,0	48,0	5'-Biotin	5'- TTTTTATCAAGACAATTAATTTAAG -3'

3.1.13.2 PCR-Protokoll A (Long et al.)

Folgende Komponenten werden zum Ansetzen der *Francisella tularensis* PCR-Reaktion (optimiert) benötigt (vgl. Tabelle 3-5):

Tabelle 3-14: Komponenten des *F. tularensis* PCR Reaktionsansatzes A

Komponenten	Volumen [µl]
A	ad 25
B	2,5
C	1,0
D	0,5
E	je 1,0
F	0,2
G	1,0
H	1,0
I	1,0
J	0,15

Unter Verwendung der Primer-Kombination FT393 / FT642-Dig wird die PCR mit dem folgenden optimierten Thermoprofil durchgeführt. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 250 bp.

Tabelle 3-15: *F. tularensis* PCR Temperatur-Zeit-Profil A

Schritt	Zeit	Temperatur
Dekontamination (optional)	30 min	37 °C
initiale Denaturierung	5 - 10 min	95 °C
39-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	45 sec	94 °C
Anlagerung	30 sec	60 °C
Synthese	45 sec	72 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

3.1.13.3 PCR-Protokoll B (Junhui et al.)

Als alternatives PCR System für die Etablierung des *Francisella tularensis* PCR-ELISA wurde das System von Junhui et al. (1996) getestet. Die bei diesem PCR-System verwendeten Primer sind in Tabelle 3-13 aufgeführt. Die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Komponenten werden zum Ansetzen der PCR-Reaktion nach Originalprotokoll benötigt (vgl. Tabelle 3-5).

Tabelle 3-16: Komponenten des *F. tularensis* PCR Reaktionsansatzes B

Komponenten	Volumen [µl]
A	17,925
B	2,5
C	0,75
D	0,125
E	je 1,25
F	0,2
G	1,0
H	1,0

Unter Verwendung der Primer-Kombination P1-P2, P2-P3 bzw. P1-P4 wird die PCR mit dem folgenden Thermoprofil durchgeführt. Die Länge des jeweiligen Amplifikationsproduktes beträgt 568 bp, 347 bp bzw. 211 bp.

Tabelle 3-17: *F. tularensis* PCR Temperatur-Zeit-Profil B

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	10 min	97 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	1 min	95 °C
Anlagerung	1 min	55 °C
Synthese	1 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	10 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

3.1.13.4 PCR-Protokoll C (Fulop et al.)

Als weitere Alternative für das *Francisella tularensis* PCR-ELISA-System wurde das verschachtelte PCR-System von Fulop et al. (1996) getestet. Die inneren Primer dieser verschachtelten („nested“) PCR hybridisieren innerhalb des Abschnittes, der von dem ersten äußeren Primerpaar vorgegeben wird.

Die bei diesem PCR-System verwendeten Primer sind in Tabelle 3-13 aufgeführten. Tabelle 3-18 zeigt die notwendigen Komponenten für diesen PCR-Reaktionsansatz nach dem Protokoll von Fulop et al. (1996) (vgl. Tabelle 3-5).

Tabelle 3-18: Komponenten des *F. tularensis* PCR Reaktionsansatzes C

Komponenten	Volumen [µl]
A	11,1
B	2,5
C	2,0
D	0,75
E	je 3,75
F	0,15
G	1,0
H	1,0

Unter Verwendung der Primer-Kombination FNA8L-FNB8L (äußere Primer) und FNA7L-FNB1L (innere Primer) wird die „nested“ PCR mit dem folgenden Thermoprofil durchgeführt. Die PCR wird zunächst mit den äußeren Primern durchgeführt. Danach wird aus diesem PCR-Reaktionsansatz 1 µl in die nachfolgende nested PCR mit den inneren Primern eingesetzt. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 900 / 409 bp.

Tabelle 3-19: *F. tularensis* PCR Temperatur-Zeit-Profil C

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	3 min	95 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	15 sec	95 °C
Anlagerung	15 sec	55 °C
Synthese	30 sec	72 °C
finaler Syntheseschritt	10 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

3.1.14 ORTHOPOCKENVIREN NACHWEISSYSTEM

Auf der Basis des 14 kDa Fusionsprotein-Gens (Meyer *et al.* 1994), das für ein immunogenes Oberflächenprotein mit zum Teil neutralisierenden Epitopen kodiert, wurde von Meyer (personal communication) ein Genus spezifisches PCR-System für die Orthopockenviren aufgebaut. Mit dem Primerpaar 14-up/14-low liegt die erwartete Größe der Amplifikate bei 280 bis 315 bp. Die Schwankungen der Amplifikatgröße sind durch Sequenzabweichungen bei den einzelnen Orthopockenviren Spezies bedingt.

3.1.14.1 Oligonukleotide

Tabelle 3-20: Oligonukleotide für das Orthopockenviren Nachweissystem

Bezeichnung	GC (%)	T _m (°C)	Markierung	Sequenz
<i>PCR Primer</i>				
14-up	50,0	56,6	5'-Dig	5'-ATGGACGGAACTCTTTTCCC -3'
14-low	50,0	56,0	-	5'-TAGCCAGAGATATCATAGCCGC -3'
<i>Scramble Primer</i>				
SCR-OP1	50,0	75,2	-	5'- GACAGCGGAATTCCGTAGTC- -TGAAACTCTAAGAGCGGCTATG -3'
SCR-OP2	50,0	75,1	-	5'- GACTACGGAATTCCGCTGTC- -AACTTCATCGTTGCGTTTAC -3'
A-OP1	46,2	69,9	-	5'- CTATAGGTGGAACACCGGCATTAGATAGG- -AGAGTTCAAG -3'
A-OP2	46,2	75,9	-	5'- CGCAGTAATGCTCGCAACATTAACATCTT- -GAACCGTTGG -3'
<i>Sonden</i>				
OP-1	39,7	55,5	5'-Biotin	5'- GCGTGATTTTCCAACCTAAATAG -3'
OP-2	34,8	52,9	5'-Biotin	5'- GCATGATTTTCCAACCTAAATAG -3'
OP-3	34,8	53,2	5'-Biotin	5'- GCATGATTTTCC AGTCTGAATAA -3'
OP-4	43,5	55,8	5'-Biotin	5'- GCGTGATTTTCC AGTCTGAATAG -3'
OP-1/spac	32,1	61,5	5'-Biotin	5'- TTTTT GCGTGATTTTCCAACCTAAATAG -3'
OP-2/spac	29,6	58,5	5'-Biotin	5'- TTTTT G CAT GATTTTCCAACCTAAATAG -3'
OP-3/spac	28,6	59,9	5'-Biotin	5'- TTTTT G CAT GATTTTCC AGTCTGAATAA -3'
OP-4/spac	35,7	62,0	5'-Biotin	5'- TTTTT GCGTGATTTTCC AGTCTGAATAG -3'
STp12/19	55,0	55,7	5'-Biotin	5'- GACTACGGAATTCCGCTGTC -3'
STp12/19/spac	44,0	62,4	5'-Biotin	5' TTTTT GACTACGGAATTCCGCTGTC -3'

fett gedruckte Nukleotide zeigen Abweichungen in der Sondensequenz an

3.1.14.2 PCR-Protokoll

Folgende Komponenten werden zum Ansetzen der Orthopockenviren PCR-Reaktion benötigt (modifiziertes Protokoll) (vgl. Tabelle 3-5):

Tabelle 3-21: Komponenten des Orthopockenviren-PCR Reaktionsansatzes

Komponenten	Volumen [µl]
A	ad 25
B	2,5
C	1,0
D	0,5
E	je 0,5
F	0,2
G	1,0
H	1,0
I	1,0
J	0,15

Unter Verwendung der Primer-Kombination 14-up-Dig/ 14-low wird die PCR mit dem folgenden modifizierten Thermoprofil durchgeführt. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 280 bis 315 bp.

Tabelle 3-22: Temperatur-Zeit-Profil Orthopockenviren

Schritt	Zeit	Temperatur
Dekontamination (optional)	30 min	37 °C
initiale Denaturierung	5 - 10 min	95 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	40 sec	94 °C
Anlagerung	40 sec	63 °C
Synthese	45 sec	72 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 - 10 °C

UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER SYSTEMANSÄTZE

3.1.15 OPTIMIERUNG DER PCR REAKTIONSBEDINGUNGEN

Ausgangspunkt sind in der vorliegenden Arbeit verschiedene PCR Methoden (Willems *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1993; Fulop *et al.*, 1996; Junhui *et al.*, 1996; Meyer, 1998, pers. comm.), die zur Optimierung der jeweiligen PCR-Bedingungen mehr oder weniger stark modifiziert werden. Um eine größtmögliche Empfindlichkeit und Spezifität in der PCR-Reaktion zum Nachweis des jeweiligen Erregers zu erreichen, werden die Konzentration von Primern, Desoxynukleosidtriphosphaten (dTTP's bzw. dUTP's), Magnesiumionen und der *Taq*-DNA-Polymerase optimiert. Ferner wird das Temperaturprofil durch Variation der Zykluszeiten, der Zykluszahl und der verwendeten Annealing-Temperatur optimiert.

Die Konzentrationen der verschiedenen Komponenten wurden jeweils in den folgenden Bereichen getestet:

Primer 0,2 – 1,0 mM

MgCl₂ 0,5 – 5,0 mM

Taq-DNA- 0,25 – 1,0 U

Polymerase

dTTP's / dUTP's 0,2 – 0,3 mM

Außerdem wurde überprüft, in wie weit sich die Verwendung von dUTP's statt dTTP's auf die Sensitivität der einzelnen Nachweissysteme auswirkt. Dazu wurde im Reaktionsansatz dTTP vollständig durch dUTP ersetzt. Anschließend wurde der Einfluß von UNG auf die PCR untersucht (vgl. auch Kap. 3.1.18).

3.1.15.1 Überprüfung der Spezifität der PCR-Primer

Die Spezifität der einzelnen Primer Systeme wird mit der DNA der verfügbaren Wildtyp-Isolate (Tabelle 3-1 bis 3.3) getestet. Außerdem werden ca. 50 weitere Bakterienspezies sowie verfügbare Zellextrakte von Viren, Pilzen, Tier- und Humanzellen untersucht (Tabelle 3-4). Dabei handelt es sich um verwandte Spezies, potentielle Begleitkeime bzw. Begleit-DNA sowie um andersartige (heterologe) Keime, die zur Verifizierung der Spezifität der Primer eingesetzt werden.

3.1.15.2 Ermittlung der Sensitivität der PCR-Systeme

Um die Sensitivität der ausgewählten PCR-Systeme zu ermitteln, wird eine dekadische Verdünnungsreihe von 1 ng bis 1 fg bzw. 1 ag der jeweiligen genomischen DNA amplifiziert. Die PCR wird mit dem entsprechenden Primerpaar bei den jeweils ermittelten Amplifikationsbedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.12,

3.1.13, 3.1.14). Die Auswertung erfolgt durch die Darstellung der Amplifikate nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (Kap. 3.1.11).

3.1.16 OPTIMIERUNG DES DNA-NACHWEISVERFAHRENS

3.1.16.1 *Design von DNA-Sonden*

Der Nachweis von DNA nach dem Prinzip des ELISA erfolgt über DNA-DNA-Hybridisierung mit einer Fangsonde.

A Reinigung von DNA-Amplifikaten

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Produkten) wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt:

1. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Dieses Verfahren wird zur Trennung und Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten bestimmter Größe angewandt. Die DNA-Fragmente werden über eine präparative Gelelektrophorese (Kap. 3.1.11) aufgereinigt. Die Elution der Fragmente aus der Agarose erfolgt entsprechend dem QIAquick™ Handbuch (Qiagen) mittels QIAquick™ Gel-Extraction Kit (Kap. 3.1.4).

2. Isolierung und Reinigung der DNA aus Reaktionsgemischen

Zur Abtrennung von Salzen, Enzymen, Proteinen und einzelner Nukleotide nach erfolgter PCR wird der QIAquick™ PCR Purifikation Kit (Kap. 3.1.4) der Firma QIAGEN eingesetzt. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

B DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach der Kettenabbruchmethode (Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.*, 1977) entsprechend den Herstellerangaben der Firma Biozym³¹ als "Cycle-Sequencing". Zur Markierung der synthetisierten DNA-Abbruchfragmente werden Fluoreszenz markierte Primer (5'-IRD-800) der Firma MWG³² eingesetzt. Die Sequenzanalysen erfolgen mit Hilfe des DNA-Sequencers Model 4000 L der Firma LI-COR Inc.³³ und dem „SequiTherm EXEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-LC" (Kap. 3.1.4). Die Auftrennung der Produkte der Sequenzierreaktionen erfolgt in Polyacrylamidgelen. Es wird je nach Länge des zu

³¹ Biozym Diagnostik GmbH / D-31833 Hess.Oldendorf; www.biozym.com

³² MWG Biotech / D-85560 Ebersberg; www.mwg-biotech.com/

³³ LI-COR inc.; www.licor.com/

sequenzierenden DNA-Abschnittes mit 41 cm (6 %) oder 66 (4,5 %) cm Polyacrylamidgelen gearbeitet. Die Gele werden entsprechend den Herstellerangaben des SequaGel[®] XR Konzentrats³⁴ hergestellt. Zur Erfassung und Auswertung der durch das Lasererfassungssystem detektierten Daten wird das Softwarepaket Base ImageIR[®] V4.0 der Firma LI-COR eingesetzt. Die weitere Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wird mit Hilfe der Software DNASTar[®] V 4.0 vorgenommen.

Die einzelnen Sequenzierreaktionen werden entsprechend dem nachfolgenden Pipettierschema durchgeführt. Als DNA-Matrix dienen gereinigte PCR-Amplifikate (Kap. 3.1.16.1.A).

Tabelle 3-23: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR

Prämix für 4 Reaktionen			
SequiTherm [™] Sequencing Buffer	1,8	µl	
Primer	2,0	µl	1-2 pmol, 5'-IRD800-markiert
DNA-Matrize	ca. 100 -150 fmol		
SequiTherm [™] Taq-Polymerase	1,0	µl	
PCR-Wasser	auffüllen auf 16 µl Reaktionsvolumen		
4x Einzelreaktion			
SequiTherm [™] ddNTP	2,0	µl	G/A/T/C -Reaktion
Prämix	3,8	µl	

Die einzelnen Reaktionen werden mit Mineralöl abgedeckt. Die Amplifikation wird nach dem folgenden Thermoprofil durchgeführt:

³⁴ Biozym Kat. Nr. 901610 und 900003; Biozym Diagnostik GmbH / D-31833 Hess.Oldendorf; www.biozym.com

Tabelle 3-24: Temperatur-Zeit-Profil der Sequenzierung

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	5 min	95 °C
30-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	30 sec	95 °C
Anlagerung	15 sec	43 - 55 °C*
Synthese	1 min	70 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 °C - 10 °C
Denaturierung nach Zugabe von 3µl Stop/Ladepuffer	5 min	95 °C

* Temperatur abhängig vom verwendeten Primer

3.1.16.2 Nachweis von PCR-Amplifikaten in der Mikrotiterplatte

Bei der Flüssigphasenhybridisierung erfolgt der kolorimetrische Nachweis in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten. Dazu werden biotinylierte Fangsonden und 5'-Digoxigenin markierte Primer verwendet.

A Begriffe

Im folgenden werden verschiedene häufig im Zusammenhang mit dem PCR-ELISA verwendeten Begriffe erläutert:

- Der Nachweis von (PCR-) Amplifikaten mittels PCR-ELISA beschreibt immer den Nachweis eines mit Digoxigenin markierten DNA-Einzelstranges über ein Hybridisierungsereignis zwischen Fangsonde und hierzu komplementären Sequenzabschnitt.
- Der Begriff Wildtyp bezeichnet die nachzuweisende Ziel-DNA des jeweiligen Erregers.
- Als interner Standard und Amplifikationskontrolle wird eine interne Kontroll-DNA verwendet. Diese Begriffe werden synonym verwendet. Diese Standard- bzw. Kontroll-DNA wird mit der jeweiligen Standard-Sonde im PCR-ELISA detektiert.

B Detektionsprinzip

Das ELISA-Verfahren (**E**nzym **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay) dient der Detektion von PCR-Amplifikaten mittels einer enzymatischen Farbreaktion im Mikrotiterplattenformat. Hierfür stehen eine Mikrotiterplatte für das Wildtyp-Ergebnis

und eine Mikrotiterplatte für die interne Amplifikationskontrolle zur Verfügung. Die alkalisch denaturierten PCR-Amplifikate (markierter Einzelstrang) hybridisieren in einer 30-minütigen Reaktion mit der Sonde der Mikrotiterplatte. In einer zweiten Reaktion bindet der an ein Enzym gekoppelte Antikörper an das Digoxigenin der markierten, gebundenen Amplifikate. Die Zugabe von Farbreagenz führt zur Bildung eines blauen Farbstoffes durch das Enzym. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet und die Extinktion des gelben Farbstoffes im ELISA-Reader bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

C Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Fangsonde

Für den Nachweis von Amplifikaten werden Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten³⁵ mit einer Biotin Bindekapazität von ~7 ng/well verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Einsatzmenge der jeweiligen Sonde werden in einer Versuchsreihe die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Mengen (0,5 bis 2,0 pmol/Ansatz) biotinylierter Fangsonde in 200 µl Bindungspuffer (Anhang) über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Verwendung zur Hybridisierung wird der Bindungspuffer entfernt.

D Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA

Probenvorbereitung

Zu jedem PCR-Ansatz wird 1 Volumen Denaturierungspuffer (Anhang) zugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Hybridisierung und Detektion

Pro Kavität werden 10 µl des Denaturierungsansatzes aufgetragen und 100 µl Hybridisierungspuffer zugefügt. Die Hybridisierung erfolgt bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (Kap. 3.2.2.2C, 3.2.3.2D, 3.2.4.2C) für 30 Minuten. Nicht gebundenes Amplifikat wird durch 4x 2 Minuten Waschen mit 200 µl Waschpuffer I (Anhang) pro Kavität bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-POD-Fab-Fragment³⁶. Dazu wird in jede Kavität je 100 µl einer in Waschpuffer II (Anhang) verdünnten Antikörperlösung gegeben. Nach der Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wird 4x 2 Minuten mit Waschpuffer II bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 100 µl BM-Blue³⁷ pro Kavität. Nach der Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wird die Farbreaktion durch Zugabe von je 100 µl Stopp-Reagenz

³⁵ Nunc F8 Maxi Sorp Kat. Nr. 439454; Nunc GmbH & Co. KG / D-65083 Wiesbaden; <http://www.nalgenunc.com/>

³⁶ Roche Kat. Nr. 1207733; F. Hoffmann-La Roche AG / Ch-Basel; www.roche.com/diagnostics/

³⁷ Roche Kat. Nr. 1432559

(Anhang) gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgt im ELISA-Reader³⁸, Meßparameter sind für den Meßfilter 450 nm, für den Referenzfilter 650 nm.

E Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit dient die von Scheu (1999) verwendete Methode zum kolorimetrischen Nachweis von PCR-Amplifikaten in der Mikrotiterplatte nach dem Prinzip des ELISA als Grundlage. Diese wurde zur Optimierung der jeweiligen Nachweis-Bedingungen mehr oder weniger stark modifiziert. Die durchgeführten Experimente wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mindestens einmal wiederholt.

Um eine größtmögliche Empfindlichkeit und Spezifität zum Nachweis des jeweiligen Erregers mittels PCR-ELISA zu erreichen, werden die Konzentration einiger ELISA-Komponenten optimiert. Ferner wird das Protokoll durch Variation der verwendeten Hybridisierungs-Temperatur optimiert. Zur Optimierung der Temperatur werden die Hybridisierungen im Bereich von 37 bis 55 °C durchgeführt. Die eingesetzte Salzkonzentration des Waschpuffers liegt zwischen 0,1 und 1,0 x SSC. Die Konzentration der biotinylierten Fangsonden wird im Bereich von 0,5 bis 2,0 pmol/Ansatz variiert. Der Antikörper wurde in einer 1:3000 und 1:6000 Verdünnung eingesetzt.

F Ermittlung der Nachweiseffizienz

Wildtyp- und Standard-DNA wird in dekadischen Verdünnungen von 1 ng bis 1 ag mit der entsprechenden Primerkombination amplifiziert. Der Nachweis der Amplifikate wird durch spezifische Hybridisierung in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese waren zuvor mit der jeweils als optimal bestimmten Menge der entsprechenden Fangsonde beschichtet worden. Der Ausschluß einer unspezifischen Hybridisierung erfolgt durch Kreuzhybridisierung zwischen Amplifikaten der Wildtyp-DNA mit der Standard-Fangsonde, sowie zwischen Wildtyp-Fangsonde und Amplifikaten der Standard-DNA.

³⁸ Molecular Devices Kinetic Microplate Reader V_{max} / www.moldev.com/

G Bestimmung der Nachweisgrenze („cut-off“)

Um die Nachweisgrenzen der PCR-ELISA Systeme zu ermitteln, wird eine dekadische Verdünnungsreihe von 1 ng bis 1 fg bzw. 1 ag der jeweiligen genomischen DNA amplifiziert. Die PCR wird mit dem entsprechenden Primerpaar bei den jeweils ermittelten Amplifikationsbedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.12, 3.1.13, 3.1.14). Es werden mindesten 3 Negativkontrollen mitgeführt. Die Auswertung erfolgt durch eine kolorimetrische Detektion der Amplifikate in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten (Kap. 3.1.16.2) unter den optimierten Hybridisierungsbedingungen.

3.1.17 IMPLEMENTIERUNG EINER AMPLIFIKATIONSKONTROLLE

Als Kontroll-DNA (interner Standard) dient modifizierte Wildtyp-DNA mit einem 20 bis 25 bp langen Insert, das den jeweiligen spezifischen Wildtyp Sondenbereich ersetzt. Die Modifikation erfolgt über *in vitro* Mutagenese mittels PCR. Die hierzu verwendeten Primer („Scamble Primer“) sind im entsprechenden Kapitel der verschiedenen Nachweissysteme aufgelistet (Kap. 3.1.12, 3.1.13, 3.1.14). Das jeweils entstandene Standard-DNA Fragment wird zur Verifizierung sequenziert.

3.1.17.1 *In vitro* Mutagenese mittels PCR

Das Design von Primern zur *in vitro* Mutagenese mittels PCR wird nach Abgleich der Sequenzdaten der jeweiligen Wildtyp-Isolate vorgenommen (vgl. Anhang). Der Sequenzabgleich wird mit Hilfe des Programms DNASTAR 4.0 (Lasergene³⁹) durchgeführt. Durch die Kombination von je einem „Außenprimer (A-) und einem „Scamble Primer“ (SCR-) werden in zwei getrennten Reaktionen die Halbamplifikate hergestellt. In der nachfolgenden PCR mit beiden Außenprimern und einer 1:1 Mischung der PCR-Halbamplifikate als „template-DNA“ wird dann das Kontroll-DNA-Fragment hergestellt. Es wird das in Tabelle 3-25 dargestellte Thermoprofil verwendet.

³⁹ www.dnastar.com/

Tabelle 3-25: Temperatur-Zeit-Profil der PCR-Mutagenese

Schritt	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	5 min	95 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus		
Denaturierung	30 sec	94 °C
Anlagerung	30 sec	58 °C
Synthese	1,5 min	72 °C
finaler Syntheseschritt	5 min	72 °C
Endtemperatur		4 °C

3.1.17.2 Kompetitive PCR

Das Prinzip der kompetitiven PCR besteht darin, dass die Sequenz der Ziel-DNA mit der als exogenes Template zugesetzten Kontroll-DNA (modifizierte DNA) um das gleiche Primerpaar konkurriert. Zur Etablierung solcher Systeme wird die Ziel-DNA in dekadischer Verdünnung mit einer konstanten Menge an Kontroll-DNA amplifiziert. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration an zugesetzter Kontroll-DNA als internen Standard in die PCR werden mehrere kompetitive Amplifikationsreaktionen mit verschiedenen Konzentrationen interner Kontroll-DNA und einer dekadischen Verdünnungsreihe Wildtyp-DNA durchgeführt. Die Experimente werden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mindestens einmal wiederholt.

3.1.18 EINFLUß VON UNG AUF DIE SENSITIVITÄT DES PCR-ELISA

Die Uracil-N-Glycosylase bewirkt die Hydrolyse von Uracil-Glycosidbindungen in Uracil haltiger DNA. Dabei wird Uracil freigesetzt und eine alkaliempfindliche Pyrimidin freie DNA-Position geschaffen, an der die DNA-Polymerase gestoppt wird. Um festzustellen, ob UNG ohne Sensitivitätsverlust im PCR-ELISA eingesetzt werden kann, wird jeweils eine dekadische Verdünnungsreihe von 1 ng bis 1 fg bzw. 1 ag der genomischen DNA in Anwesenheit von UNG und Kontroll-DNA amplifiziert. Es werden 0,15 U UNG⁴⁰ pro Reaktionsansatz eingesetzt. Der PCR wird als enzymatischer Dekontaminationsschritt eine Inkubation des Reaktionsansatzes im PCR-Cycler für 30 Minuten bei 37 °C vorgeschaltet. Der initiale Denaturierungsschritt wird von 5 auf 10 Minuten verlängert. Im Übrigen wird die PCR mit dem entsprechenden Primerpaar bei den entsprechenden optimalen Amplifikationsbedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.12, 3.1.13, 3.1.14). Die

⁴⁰ Life Technologies Kat. Nr. 18054-015; Life Technologies GmbH / D-76131Karlsruhe; www.lifetech.com

Auswertung erfolgt durch eine kolorimetrische Detektion der Amplifikate in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten (Kap. 3.1.16.2).

3.2 ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von verschiedenen Schnellnachweissystemen (PCR-ELISA) auf Basis von PCR-Systemen in Gestalt eines einheitlichen Formates für den Anwender der durchzuführenden Untersuchungen. Andere Verfahren zum Nachweis für hochpathogene Erreger wie *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* und Orthopockenviren ermöglichen zur Zeit keine zufriedenstellende diagnostische Aussage bzw. sind noch zu zeitaufwendig, um eine schnelle Befundung zu ermöglichen. Zusätzlich sind kulturelle Anzuchtverfahren aus Sicherheitsgründen im Routinelabor nicht möglich (Risikogruppe L3) bzw. unerwünscht, da ein erhöhtes Gefahrenpotential besteht.

Es erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zur Etablierung von PCR-ELISA Nachweissystemen für die oben genannten hochpathogenen Erreger. Auf Grundlage der durchgeführten Sequenzierungen der erhaltenen PCR-Amplifikate konnte durch *in vitro* Mutagenese mittels PCR ein interner Standard entwickelt und ein kompetitives PCR-System zum Nachweis des jeweiligen Krankheitserregers etabliert werden. In Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung der Diagnostiksysteme wurde zur Verifikation der PCR-Produkte ein spezifischer kolorimetrischer DNA-Nachweis in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten etabliert. Zur Vermeidung von möglichen Kontaminationen wurde routinemäßig Uracil-N-Glycosylase im PCR-ELISA eingesetzt.

3.2.1 DNA-ISOLIERUNG

Von 19 Isolaten von *C. burnetii*, 15 *Francisella spp.* Isolaten sowie den in Tabelle 3-4 aufgelisteten heterologen Organismen wurde die DNA nach den unter Kap. 3.1.7 zuerst beschriebenen Methoden isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten genomischen DNA erfolgte durch Messung der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 230, 260 und 280 nm (Kap. 3.1.8). Dies stellte gleichzeitig eine Qualitätsüberprüfung der DNA dar. Dabei lag die Konzentration der präparierten DNA von *C. burnetii* und *F. tularensis* im Bereich von 50 – 400 ng/µl. Zum Teil lag der Koeffizient aus den Meßwerten bei 260 und 280 nm nicht im optimalen Bereich von 1,7 bis 1,9. Mangels weiterem Zellmaterial wurden diese qualitativ schlechteren DNA-Präparationen dennoch eingesetzt, jedoch nicht zur Bestimmung von Nachweiskgrenzen.

Die Qualität der durch alkalische Lyse gewonnenen DNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Präparationen mangelnder Qualität wurden nicht eingesetzt und die Präparation wiederholt.

DNA-Präparationen von 8 Orthopockenviren Isolaten wurden von Herrn PD Dr. Meyer aus München zur Verfügung gestellt. Da hier nur geringe Mengen zur

Verfügung standen, wurde die Konzentration der DNA mittels Gelelektrophorese über einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der DNA-Banden mit Banden bekannter Konzentration im Agarosegel bestimmt. Zum Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten wurden als Mengenstandards die auch für die Bestimmung des Molekulargewichtes verwendeten DNA-Molekulargewichtsmarker der Firma Roche (vgl. Abb. 3-2) eingesetzt. Dazu wurde die Intensität der Probenbande ins Verhältnis zur Intensität und DNA-Konzentration einer vergleichbaren Markerbande gesetzt. Dies ergab DNA-Konzentrationen im Bereich von 130 – 450 ng/µl für die zur Verfügung stehenden Orthopocken DNA-Präparationen.

3.2.2 ENTWICKLUNG EINES NACHWEISVERFAHRENS FÜR *COXIELLA BURNETII*

3.2.2.1 PCR-System

Basis für die Auswahl des zur Etablierung des Nachweissystems für *C. burnetii* geeigneten PCR-Systems stellte der in Tabelle 2-1 dargestellte Überblick (Veröffentlichungsdatum bis Mitte 1998) über PCR-Systeme sowie im Internet verfügbare Sequenzdaten (Genbank, NCBI) dar.

A Auswahl der Primer

PCR Primer sind über einen Bereich von ca. 20 Basen komplementär zu den Enden der zu vervielfältigenden Sequenz. Die Enden des Zielfragments einer PCR sind also durch die 5'-Enden der Primer definiert, welche als Starthilfe für die gezielte Amplifikation von DNA zum Nachweis der Krankheitserreger benötigt werden.

Zum Nachweis von *Coxiella burnetii* wird neben den Plasmiden (QpH1/QpRS/QpDG) häufig das *com1* Gen sowie die Insertionssequenz *IS1111* verwendet. Diese Sequenz bietet sich für einen sensitiven Erregernachweis auf Grund des multiplen Vorkommens im Genom besonders an (Hoover *et al.*, 1992). Die Primersysteme von Courtney *et al.* (1999) und Willems *et al.* (1994) unterscheiden sich nur geringfügig in der Zielsequenz. Willems *et al.* (1994) verwendeten aus o.g. Genregion einen 678 bp Sequenzabschnitt für den PCR-Nachweis und testeten diesen an insgesamt 42 klinischen *Coxiella*-Isolaten, sowie an 40 weiteren phylogenetisch entfernten Bakterienarten zum Ausschluß falsch negativer Resultate. Zur Etablierung eines PCR-ELISA zur Diagnostik von Q-Fieber wurde die Primerkombination Trans1/Trans2 ausgewählt.

B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen

Ausgehend von dem o.g. Originalprotokoll nach Willems *et al.* (1994) wurde das PCR-System entsprechend den in Kap. 3.1.15 beschriebenen Schritten optimiert. Dieses PCR-System war sowohl in der Zusammensetzung des Reaktionsmixes als auch im verwendeten Thermoprofil bereits gut gestaltet. Statt der von Willems *et al.* (1994) verwendeten *Tfl*-DNA-Polymerase wurde im Rahmen dieser Arbeit grundsätzlich die allgemein häufiger eingesetzte *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Entsprechend wurde die Temperatur des Syntheseschritts im PCR-Protokoll auf das Optimum dieser DNA-Polymerase von 72 °C herabgesetzt. Die Zeit für den Anlagerungsschritt konnte ohne Sensitivitätsverlust von einer Minute auf 30 Sekunden reduziert werden. Ferner wurde die Magnesiumionen-Konzentration von 1,5 mM auf 2,0 mM erhöht. In Kap. 3.1.12 ist das optimierte PCR-Protokoll dargestellt.

C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität

Zur Prüfung der Spezifität des ausgewählten Primerpaars wurde die DNA von verschiedenen Spezies / Isolaten eingesetzt. Die Spezifität der Primerkombination gegenüber unspezifischer DNA wurde durch den Einsatz von DNA einer Auswahl von Bakterien, Pilzen und Viren in die PCR getestet (Tab. 3-4). Es handelte sich dabei um einen repräsentativen Querschnitt von Vertretern phylogenetisch eng verwandter Spezies sowie eine Auswahl weiterer heterologer Mikroorganismen. Zusätzlich wurde auch humane DNA eingesetzt. Der Nachweis der Amplifizierbarkeit der mittels alkalischer Lyse (Kap. 3.1.7.1) isolierten DNA wurde unter Verwendung von allgemeinen Primern (Tabelle 3-7) belegt. Die in dieser PCR mitgeführten Negativkontrollen ergaben in der Gelelektrophorese keine Signale.

Die Spezifität des Primerpaars Trans1/Trans2 (Tab. 3-10) wurde unter Verwendung von 19 verschiedenen *Coxiella burnetii* DNA-Isolaten überprüft. Diese 19 Isolate decken nach der molekularen Charakterisation von Jäger *et al.* (1998) fast die gesamte Breite der möglichen *Coxiella*-Varianten ab. Die Amplifikationsreaktionen wurden entsprechend den für diese Primerkombination optimierten Bedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.12). Der Nachweis der Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kap. 3.1.11). Mit der genannten Primerkombination konnten spezifische DNA-Fragmente (678 bp) aller 19 in die Untersuchung einbezogenen *Coxiella burnetii* Isolate in der PCR amplifiziert werden.

Beim Nachweis von Amplifikaten im Agarosegel wurde bei Einsatz der Primerkombination Trans1/Trans2 bei keinem der getesteten heterologen DNA-Matrizen ein falsch positives Signal in Form von spezifischen Amplifikaten

beobachtet. Somit wurde die sichere Ausgrenzung möglicher Begleitflora bzw. Begleit-DNA mit dieser PCR belegt.

D Sensitivität des PCR-Systems

Um die Sensitivität der optimierten PCR-Systeme zu ermitteln, wurde wie in Kap. 3.1.15.2 beschrieben eine dekadische Verdünnungsreihe der jeweiligen genomischen DNA amplifiziert.

Zur Bestimmung der Sensitivität des *Coxiella* PCR-Systems wurde das Primerpaar Trans1/Trans2 und gereinigte *Coxiella burnetii* DNA verwendet. Die Nachweisgrenze ist nach gelelektrophoretischer Auftrennung der 678 bp langen für *Coxiella burnetii* spezifischen Amplifikate im Agarosegel abzuleiten.

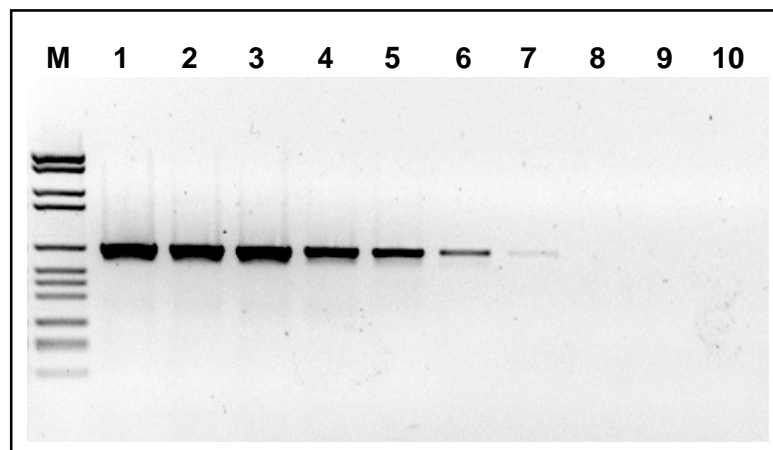


Abb. 3-3: Sensitivität des *Coxiella burnetii* PCR-Systems

Amplifikation von $4,5 \times 10^4$ bis 0 Genomäquivalenten von *Coxiella burnetii* (Priscilla) in dekadischen Verdünnungsschritten mit der Primerkombination Trans1/Trans2-Dig (Kap. 3.1.12). Invertierte Darstellung der Amplifikate nach gelelektrophoretischer Auftrennung;

Legende (Spuren von links nach rechts): M: Marker, Spur 1 bis 9: *C. burnetii* (Priscilla), 100 pg bis 1 ag initial eingesetzte genomische DNA (Verdünnungsstufen je 1:10), Spur 10: Negativkontrolle

Die Amplifikation von 100 pg – 100 fg ($\approx 4,5 \times 10^4$ bis $4,5 \times 10^1$ GÄ) an initial eingesetzter genomischer DNA von *Coxiella burnetii* mit dem Primerpaar Trans1/Trans2-Dig erbrachten im Agarosegel sehr intensive Banden. Die Amplifikation im Bereich von 10 fg bis 1 fg zeigte ebenfalls noch deutlich sichtbare Amplifikate. Bei weiterer Reduzierung auf 100 ag waren spezifische Amplifikate nur noch schwach erkennbar (Abb. 3-3). Die Menge von 100 ag initial in die PCR eingesetzter genomischer DNA entspricht weniger als 1 Genomäquivalent. Der Nachweis von weniger als einem Genomäquivalent ist auf das multiple Vorkommen der Zielsequenz von bis zu 19 Kopien im Genom (Hoover *et al.*, 1992) zurückzuführen. Durch Verwendung von dUTP statt dTTP wird bei Visualisierung der

Amplifikate nach Agarosegelelektrophorese keinen Einfluß auf die Sensitivität des Nachweises von *Coxiella burnetii* beobachtet.

3.2.2.2 Etablierung des Nachweissystems als PCR-ELISA

Die Detektion von PCR-Amplifikaten erscheint insbesondere im Zusammenhang mit der Diagnostik von Krankheitserreger unzureichend, da es sich bei diesem Verfahren um einen unspezifischen Nachweis der PCR-Produkte allein über die Größe des Produktes handelt. Für die Etablierung eines spezifischen Nachweises für *C. burnetii* wurde als DNA-Nachweisverfahren ein ELISA ausgewählt. Der ELISA wird im Anschluß an die jeweilige PCR als Spezifitätskontrolle zur Detektion der spezifischen Amplifikate mittels einer enzymatischen Farbreaktion im Mikrotiterplattenformat (vgl. Kap. 3.1.16.2) eingesetzt. Der Nachweis der spezifischen Amplifikate erfolgt hier über DNA-DNA-Hybridisierung mit einer Fangsonde.

A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte

Voraussetzung für das Design der Fangsonden ist eine genaue Analyse der Amplifikatsequenzen. Dazu wurden die gereinigten Amplifikate der verfügbaren Isolate von *Coxiella burnetii* unter Verwendung von 5'-IRD-markierten Primern (Trans1/Trans2) sequenziert (Kap. 3.1.16.1B). Die erhaltenen Sequenzdaten bildeten die Basis für das Design der Sonden und die interne Kontroll-DNA. Die Ergebnisse der Sequenzierungsarbeiten sind in der Form eines computergestützten Abgleichs aller für das Detektionssystem erbrachten Sequenzdaten in ausführlicher Form im Anhang (Abb. 7-1) dargestellt.

B Design der Fangsonden

Eine möglichst geringe Abweichung in der Länge der Amplifikate gewährleistet in der kompetitiven PCR eine vergleichbar hohe Amplifikationseffizienz. Eine Unterscheidung der Amplifikate von Wildtyp- (Ziel-DNA) und interner Kontroll-DNA im Agarosegel ist mangels ausreichendem Größenunterschied dann nicht mehr möglich. Der spezifische Nachweis der Wildtyp- (WT) und Kontroll-DNA (ST) Amplifikate wurde deshalb ausschließlich mit Hilfe spezifischer biotinylierter Fangsonden in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Aspekte, die bei der Konstruktion der Fangsonden Berücksichtigung fanden, sind einerseits die Schmelzpunkte (T_m), die für beide Oligonukleotide möglichst gleich sein sollten. Andererseits sollte die Ausbildung von Sekundärstrukturen möglichst vermieden werden. Die Überprüfung dieser Parameter erfolgte mit Hilfe des Programms DNASTAR[®] Version 4.0. Ebenso sollte sich der GC-Gehalt im Hybridisierungsbereich der entsprechenden Fangsonden möglichst nicht voneinander unterscheiden, damit identische Hybridisierungsbedingungen für Wildtyp- und Standard- Fangsonden gegeben sind.

Der Sequenzvergleich der aus den zur Verfügung stehenden *Coxiella burnetii* Isolaten erhaltenen Amplifikationsprodukten (678 bp) zeigte einen sehr hohen Homologiegrad innerhalb der Gruppe (vgl. Anhang). Es traten nur vereinzelt Punktmutationen auf. Da nach den vorliegenden Ergebnissen keine unspezifischen Amplifikate beobachtet wurden, stand der gesamte Bereich des Amplifikats, ausgenommen die Punktmutationen enthaltenden DNA-Sequenzabschnitte, für eine potentielle Wildtyp-Sonde zur Verfügung. Wildtyp- und Standard-Fangsonde wurden als 20mere konstruiert und waren am 5' Ende mit einer Biotinmarkierung versehen. Nachfolgend ist ein Ausschnitt (Sondenbereich 520 – 550, vgl. Anhang) von 30 Basen der *Coxiella burnetii* Wildtyp- und Kontroll-DNA Sequenz dargestellt. Der Bereich der Fangsonden ist grau unterlegt. Die beiden Fangsonden unterscheiden sich nicht im GC-Gehalt und nur unwesentlich in der Schmelztemperatur ($\Delta = 0,2$ °C).

Coxiella Wildtyp-Sequenz 5' AGGATTGTCAACGGGTACAGAGCATCCGGG 3'
Coxiella Kontroll-DNA 5' AGGATTGACTACGGAATTCGCTGTCGGG 3'

Abb. 3-4: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs *Coxiella burnetii*

C Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Zur Optimierung des Nachweisverfahrens wurden verschiedene Parameter des ELISA (vgl. Kap. 3.1.16.2E) variiert. Die Variation von Hybridisierungstemperatur und Salzkonzentration des Waschpuffers zeigte keine nennenswerten Einflüsse auf das Ergebnis des ELISA. Die Erhöhung der Antikörperkonzentration durch Einsatz einer Verdünnung von 1:3000 statt 1:6000 verbesserte insgesamt die Signalhöhe bei der kolorimetrischen Detektion der *Coxiella burnetii* Amplifikate. Die Tabelle 3-26 faßt die Ergebnisse der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis von *C. burnetii* nach dem Prinzip des ELISA zusammen (vgl. Kap. 3.1.16.2).

Tabelle 3-26: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von *C. burnetii* nach dem Prinzip des ELISA

<i>Coxiella burnetii</i>	
Hybridisierungstemperatur	50 °C
Inkubationszeit Hybridisierung	30 Minuten
Salzkonzentration Hybridisierungspuffer	2,5 x SSC
Salzkonzentration Waschpuffer 1	1,0 x SSC
Wildtyp-Fangsonde	1,5 pmol pro Kavität
Standard-Sonde	1,5 pmol pro Kavität
Verdünnung des Antikörpers	1:3000

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis von *C. burnetii* nach dem Prinzip des ELISA zusammen. Der ELISA wird im Anschluß an die jeweilige PCR als Spezifitätskontrolle zur Detektion der spezifischen Amplifikate mittels einer enzymatischen Farbreaktion im Mikrotiterplattenformat eingesetzt.

D Bestimmung des „cut-off“

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde wie in Kap. 3.1.16.2G beschrieben eine dekadische Verdünnungsreihe der genomischen DNA von *C. burnetii* amplifiziert und die PCR Produkte im ELISA detektiert. Im Anschluß an die Detektion der PCR Produkte erfolgte die Festlegung der Nachweisgrenze für den kolorimetrischen DNA-Nachweis mittels PCR-ELISA durch die Berechnung des „cut-off“ Wertes aus dem Mittelwert der Negativkontrollen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung. Die angegebenen Nachweisgrenzen beziehen sich jeweils auf die initial in die PCR eingesetzten DNA-Mengen.

Nach kolorimetrischer Verifizierung der spezifischen Amplifikationsprodukte von *C. burnetii* mittels PCR-ELISA (Kap. 3.1.16.2) wurden nach Ende der Farbreaktion

Extinktionen im Bereich von 1,25 bis 4,0 gemessen (Abb. 3-5). Als „cut-off“ Wert für die Messung nach 15 Minuten wurde entsprechend der o.g. Formel eine Extinktion von 0,044 ermittelt. Unter Berücksichtigung dieses Wertes liegt die Nachweisgrenze für dieses Detektionssystem somit im Bereich von ca. einem Genomäquivalent. Für eine sichere Diagnose von Q-Fieber im medizinischen Bereich sollte der cut-off Wert um einen sog. „Sicherheits-Zuschlag“ erhöht werden. Die Nachweisgrenze liegt dann bei einer Extinktion von 0,2. Dies erhöht die Sicherheit des Nachweises, wobei die Sensitivität des Systems nicht beeinflusst wird.

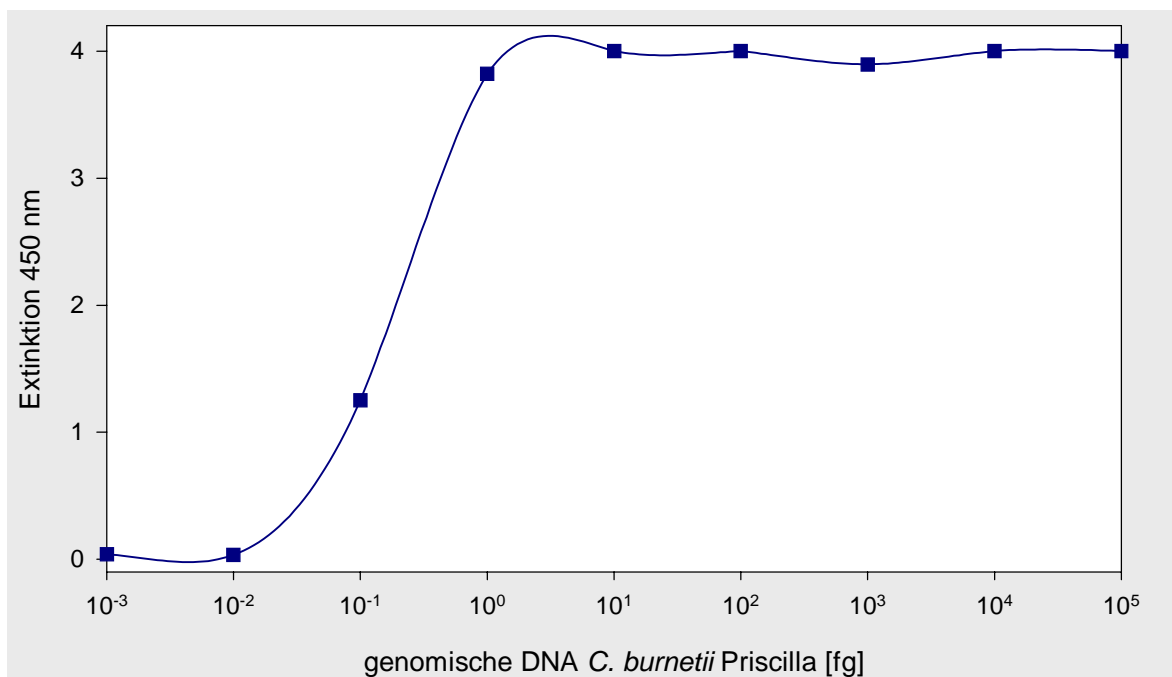


Abb. 3-5: Sensitivität des *C. burnetii* PCR-ELISA

Amplifikation von 1 ag bis 100 pg genomischer DNA *Coxiella burnetii* (Priscilla) in dekadischen Verdünnungsschritten mit der Primerkombination Trans1/Trans2-Dig (Kap. 3.1.12) und Kolorimetrischer Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) in einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte.

Der Nachweis von *C. burnetii* Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA ist jeweils mit einer Nachweisgrenze von 100 ag bzw. ~1 GÄ möglich. Der PCR-ELISA weist jedoch gegenüber einer klassischen PCR mit Nachweis der Amplifikate im Gel eine höhere Spezifität auf, da nur spezifische Amplifikate über das Hybridisierungsereignis nachgewiesen werden.

3.2.2.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle

Zum Ausschluß falsch negativer PCR-Resultate sollten Amplifikationskontrollen durchgeführt werden. Der Einsatz von Kontroll-DNA als internen Standard wird von

verschiedenen Arbeitsgruppen (vgl. Kap. 2.4.3) als zuverlässige Methode beschrieben.

A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit kommt ein interner Standard in Form einer von der Ziel-DNA abgeleiteten Sequenz (Kontroll-DNA) zum Einsatz. Die Kontroll-DNA wird dem jeweiligen Reaktionsansatz in definierter Konzentration zugesetzt und stets parallel zu der möglicherweise in der Probe vorhandenen Wildtyp-DNA amplifiziert.

Auf der Grundlage des wie in Kapitel 3.2.2.2A beschrieben erstellten Abgleichs der Amplifikatsequenzen wurde für das jeweilige Nachweissystem durch eine PCR *in vitro* Mutagenese eine interne Kontroll-DNA hergestellt (Kap. 3.1.17.1). Durch diese Substitutionsmutation wurde der zur Wildtyp-Fangsonde komplementäre Sequenzbereich gegen den zu der Standard-Sonde komplementären Sequenzabschnitt ausgetauscht. Die für dieses Nachweissystem verwendeten Primer sind in Kapitel 3.1.12 aufgelistet. Es entstand so das Kontroll-DNA Fragment für *C. burnetii* (1046 bp). Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten Kontroll-DNA erfolgte photometrisch nach Durchführung einer präparativen Gelelektrophorese und anschließender Elution des PCR-Produkts aus der Agarose mittels Extraktions-Kit (Kap. 3.1.4). Die Korrektheit der Sequenz jeder einzelnen Kontroll-DNA wurde mittels Sequenzierung (Kap. 3.1.16.1B) überprüft.

B Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA

Die genaue Bestimmung der Amplifikationseffizienz ist eine wesentliche Voraussetzung zur Nutzung eines internen Standards (Kontroll-DNA) zur möglichen Quantifizierung von PCR-Produkten. Eine Quantifizierung steht bei der geplanten medizinischen Anwendung der Nachweissysteme jedoch nicht im Vordergrund, weshalb die hier dargestellten Ergebnisse sich auf einen einfachen Vergleich beschränken.

Eine dekadische Verdünnungsreihe der Wildtyp- und Standard-DNA wurde jeweils in einer PCR amplifiziert. Die Auswertung erfolgte über Gelelektrophorese (Kap. 3.1.11) sowie durch Hybridisierung der Amplifikate in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten entsprechend den in Tabelle 3-26 definierten Bedingungen.

Für das *C. burnetii* Detektionssysteme waren in der PCR wie auch im ELISA jeweils vergleichbare Kopienzahlen an initial in die PCR eingesetzter Wildtyp- bzw. Kontroll-DNA nachweisbar. Unabhängig von der Methode des Nachweises der Amplifikate wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Die Abweichung in der Zahl der amplifizierbaren Kopien Wildtyp- gegenüber interner Kontroll-DNA war kleiner Faktor

10. Die Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA weist damit keinen wesentlichen Unterschied auf.

C Einstellung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration

Der Zusatz einer Kontroll-DNA als internen Standard in die PCR dient der Überprüfung der Amplifizierbarkeit der potentiell in der Probe vorhandenen Ziel-DNA. Die Konzentration der in die PCR eingesetzten internen Kontroll-DNA ist so zu wählen, dass bei Abwesenheit von Ziel-DNA in einer Probe die zugesetzte Kontroll-DNA amplifiziert wird und eine eindeutige Extinktion im ELISA liefert. Bei Anwesenheit von Ziel-DNA soll die Amplifikation in der kompetitiv verlaufenden PCR zugunsten der nachzuweisenden Erreger-DNA erfolgen. Um dies zu gewährleisten, werden kompetitive Amplifikationsreaktionen mit verschiedenen Konzentrationen interner Kontroll-DNA und einer dekadischen Verdünnungsreihe Wildtyp-DNA durchgeführt. Der Einsatz von interner Kontroll-DNA erfolgt in Konzentrationen von 10 ag bis maximal 2,5 fg. Genomische Wildtyp-DNA wurde im Konzentrationsbereich von 1 ag bis 1 ng verwendet. Als Kontrollen dienen Reaktionen mit entweder Wildtyp- oder Kontroll-DNA allein. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für das *Coxiella burnetii* Nachweissysteme.

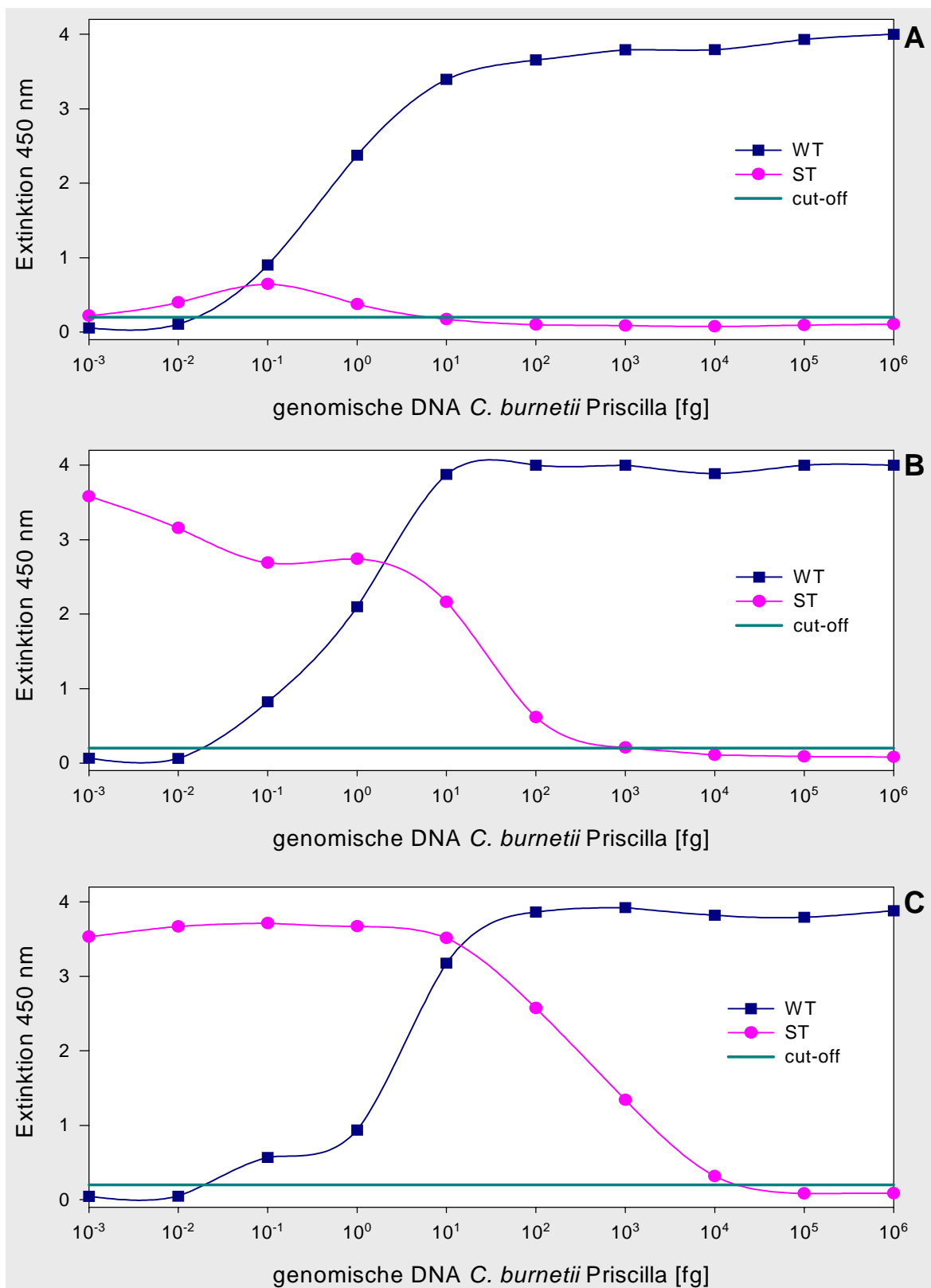


Abb. 3-6: Ermittlung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration zur Detektion von *C. burnetii* (kompetitive PCR)

Kompetitive PCR von 25 ag (Grafik A), 250 ag (Grafik B) bzw. 2,5 fg (Grafik C) Kontroll-DNA mit 1 ag bis 1 ng genomischer DNA *C. burnetii* (Priscilla) mit der Primerkombination Trans1/Trans2-Dig und Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) durch Einsatz von spezifischen biotinylierten Fangsonden (WT und ST).

Durch die Verwendung unterschiedlicher Mengen an Kontroll-DNA (ST) in kompetitiver Amplifikationsreaktion mit 1 ag bis 1 ng genomischer *C. burnetii* DNA (WT; *C. burnetii* Stamm Priscilla) kann der jeweilige Bereich der meßbaren Extinktionen ermittelt werden.

Der Nachweis von 0,1 bis 1 ng *C. burnetii* DNA wurde durch den Zusatz von 0,025 fg bzw. 0,25 fg Kontroll-DNA nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 3-6 A und 3-6 B). In beiden Fällen kann auch bei Einsatz von 0,1 fg in die PCR noch eine meßbare Extinktion ermittelt werden. Diese Werte sind vergleichbar mit der für das PCR-System ermittelten Sensitivität (Abb. 3-3 bzw. Abb. 3-5). Erst durch den Zusatz von 2,5 fg Kontroll-DNA wird die Amplifikation von *Coxiellen*-DNA beeinträchtigt. Infolge der Konkurrenz sind die gemessenen Extinktionswerte einer PCR mit < 100 fg deutlich geringer (Abb. 3-6 C).

Bei der Betrachtung der Extinktionswerte für die Kontroll-DNA waren die Werte bei Verwendung von 0,025 fg generell sehr niedrig und für den Einsatz als Amplifikationskontrolle wenig geeignet (Abb. 3-6 A). Abb. 3-6 C zeigt, dass auch der Einsatz von 2,5 fg auf Grund der auftretenden Konkurrenz des Wildtyp-Signals nicht als Amplifikationskontrolle geeignet ist. Die Amplifikationsreaktionen mit 0,25 fg Kontroll-DNA ergibt dagegen eindeutige Extinktionswerte, ohne eine Konkurrenz der Amplifikation von *Coxiellen*-DNA zu bewirken (Abb. 3-6 B). Diese Menge an interner Kontroll-DNA ist somit als Amplifikationskontrolle geeignet. Sie gewährleistet maximale Sensitivität für den Nachweis von *C. burnetii* bei eindeutigen Extinktionswerten für die Kontroll-DNA.

3.2.2.4 Einfluß von UNG auf die Sensitivität des Nachweises mittels PCR-ELISA

Der Einsatz von Uracil-N-Glycosylase (UNG) in die PCR stellt eine Methode zur Vermeidung von Kontaminationen durch „carry-over“ von Amplifikaten aus früheren Reaktionen dar, sofern diese unter Verwendung von dUTP statt dTTP amplifiziert wurden. Besonders bei einer routinemäßigen Anwendung von auf PCR basierenden Nachweissystemen zur Detektion von Krankheitserregern ist eine Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch „carry-over“ Kontaminationen wichtig, da eine Anreicherung der Amplifikate in den Laboratorien durch die häufige Durchführung der Amplifikation kaum vermeidbar ist. Deshalb wurde nach Abschluß der Etablierung der PCR-ELISA Nachweissysteme mit integrierter Amplifikationskontrolle nochmals der Einfluß von UNG auf die jeweilige Sensitivität des vollständigen PCR-ELISA untersucht.

Dazu wurde eine PCR mit dem entsprechenden Primerpaar bei den jeweils ermittelten optimalen Amplifikationsbedingungen unter Verwendung von UNG und

dUTP durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine kolorimetrische Detektion der Amplifikate in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten (Kap. 3.1.16.2).

In Abb. 3-7 sind exemplarisch die Ergebnisse für *C. burnetii* Priscilla dargestellt. Es wurden die Konzentrationen an genomischer DNA gegen die ermittelten Extinktionen der kolorimetrischen Detektion aufgetragen.

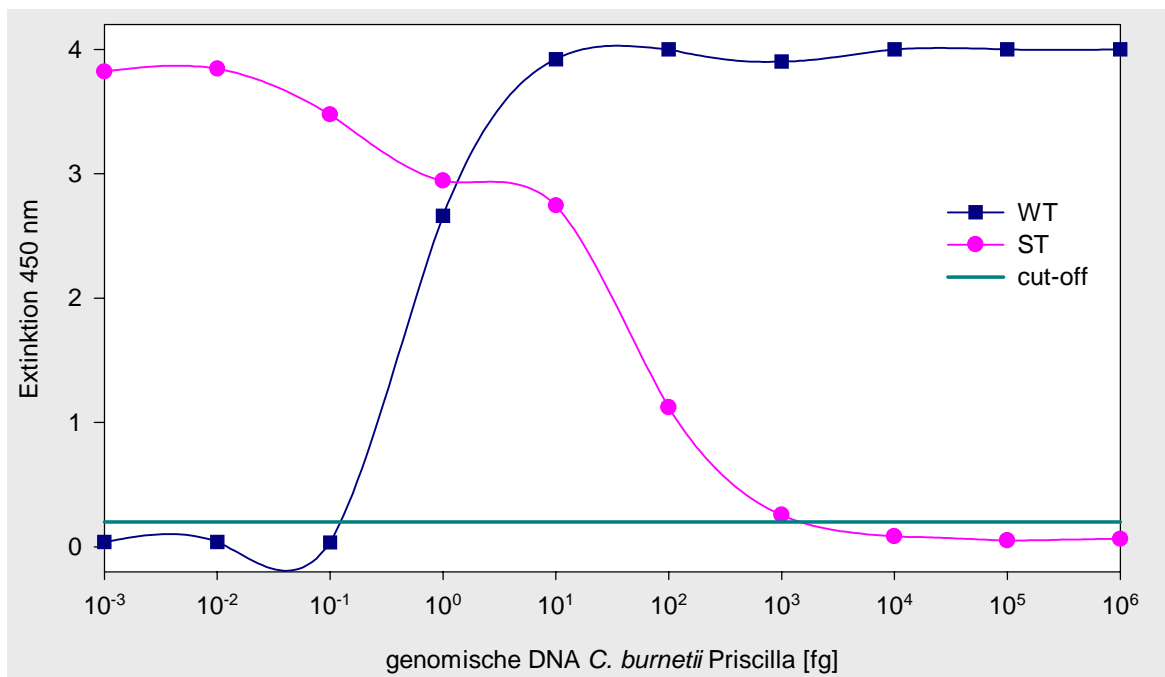


Abb. 3-7: Detektion von *C. burnetii* mittels UNG-PCR-ELISA

Amplifikation von 1 ag bis 1 ng genomischer DNA *Coxiella burnetii* (Priscilla) in dekadischen Verdünnungsschritten mit der Primerkombination Trans1/Trans2-Dig (Kap. 3.1.12) unter Verwendung von dUTP und UNG (Kap. 3.1.18) und kolorimetrischer Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) in einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte.

Für einen direkten Vergleich der Daten sind in Abb. 3-8 A und B Ergebnissen der Detektion mit und ohne Einsatz von UNG für Wildtyp und Standard dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass durch die Verwendung von UNG zum Nachweis von *C. burnetii* die Sensitivität des Nachweises beeinflusst wird.

Während ohne Dekontaminationsschritt für eine Konzentration von 100 ag Wildtyp-DNA noch eine Extinktion von 0,822 gemessen wurde, konnte diese Menge DNA unter Verwendung von UNG im PCR-ELISA nicht mehr nachgewiesen werden. Bei der Detektion von 1 fg DNA wurde in beiden Fällen eine Extinktion > 2,0 gemessen. Ein Nachweis von Mengen kleiner als 1 fg kann als grenzwertig betrachtet werden, da bereits 1 fg genomischer *C. burnetii* DNA theoretisch weniger als einem Genomäquivalent entspricht. Deshalb kann der Einfluß der Dekontamination durch UNG auf die Detektion dieser geringsten Mengen vernachlässigt werden.

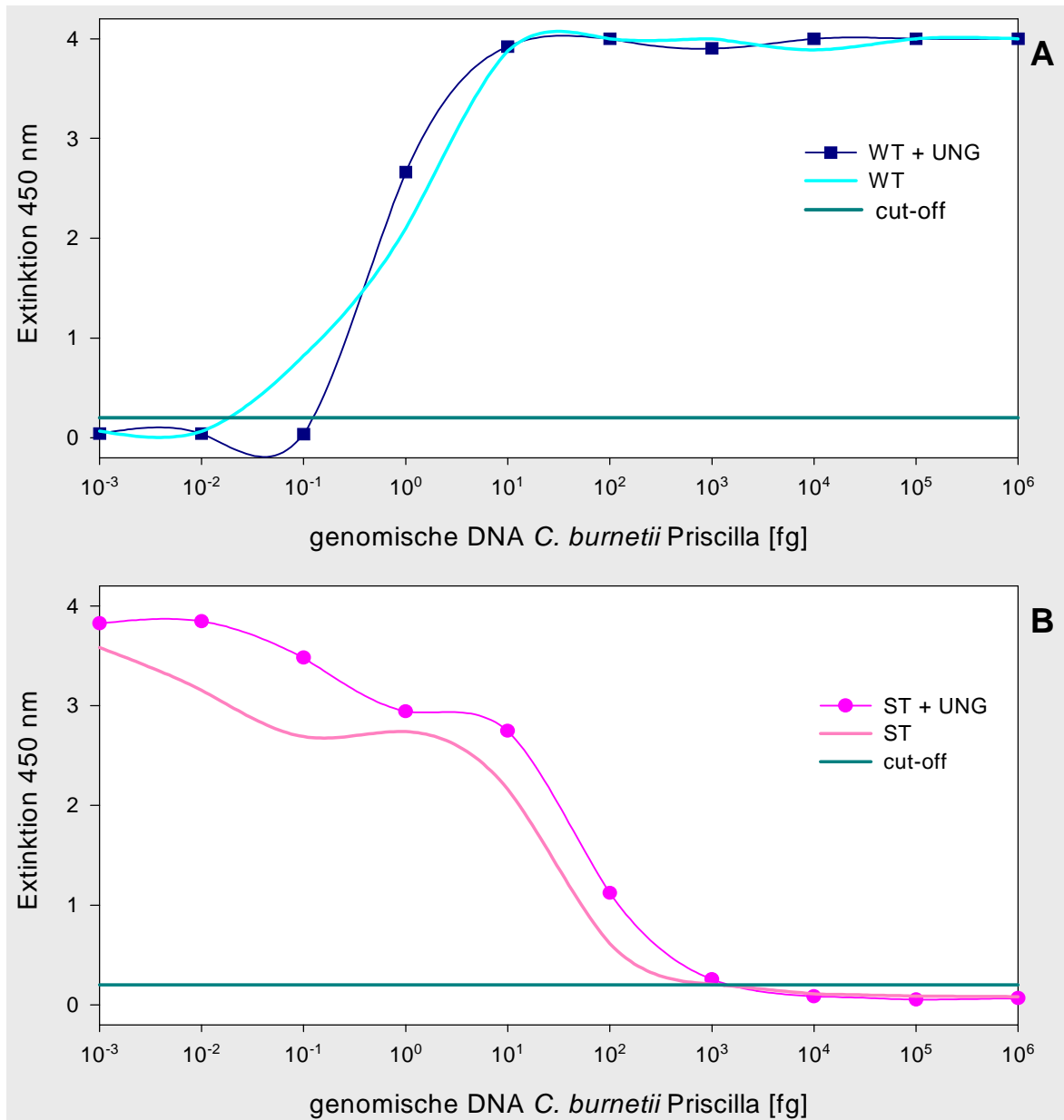


Abb. 3-8: Datenvergleich: Einfluß der Dekontamination auf den PCR-ELISA

Amplifikation von 1 ag bis 1 ng genomischer DNA *Coxiella burnetii* (Priscilla) in dekadischen Verdünnungsschritten mit der Primerkombination Trans1/Trans2-Dig (Kap. 3.1.12) unter Verwendung von dUTP mit und ohne UNG und kolorimetrischer Nachweis der Amplifikate nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) in einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte.

Grafik A: Detektion Wildtyp-Amplifikate; Grafik B: Detektion Kontroll-DNA

In analogen Untersuchungen konnte für die in den nachfolgenden Kapiteln 3.2.3 bzw. 3.2.4 ausführlich beschriebenen PCR-ELISA Systeme zum Nachweis von *F. tularensis* und Orthopockenviren gezeigt werden, dass der Einsatz von UNG keinen nennenswerten Einfluß auf die Sensitivität dieser Nachweissysteme ausübt. UNG ist zur routinemäßigen präventiven Dekontamination beim Nachweis von Krankheitserregern mittels der etablierten PCR-ELISA-Systeme geeignet.

3.2.3 ENTWICKLUNG EINES NACHWEISVERFAHRENS FÜR *FRANCISELLA TULARENSIS*

3.2.3.1 PCR-Systeme

Für die Auswahl eines geeigneten PCR-Systems zur Etablierung eines Nachweissystems für *F. tularensis* stellen die in Tabelle 2-2 zusammengestellten Systeme (Veröffentlichungsdatum bis Mitte 1998) und im Internet verfügbare Sequenzdaten die Basis dar. Die Auswahl der Primer ist entscheidend für die Güte des zu entwickelnden Nachweissystems.

A Auswahl der Primer

Francisella tularensis wird mittels PCR über Zielsequenzen im Bereich der 16S rDNA sowie häufig über Sequenzabschnitte des Membranproteins *TUL4* nachgewiesen. Mit dem Primerpaar FT393/FT642 werden nach Long *et al.* (1993) 1 KBE pro μ l dotiertem Blut nachgewiesen. Das System wurde bisher an einem Stamm (*F. tularensis* *bv palaeartica*, ATCC 29684) getestet. Neben diesem ausgewählten Primerpaar werden zum Vergleich weitere nach Fulop *et al.* (1996) bzw. Junhui *et al.* (1996) verwendet.

B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen

Ausgehend von dem Originalprotokoll (Long *et al.* 1993) wurde das PCR-System entsprechend den in Kap. 3.1.15 beschriebenen Schritten optimiert. Es wurden generell Reaktionsvolumen von 25 μ l eingesetzt. Die vier Nukleotide wurden in äquimolaren Konzentrationen von je 200 μ M verwendet. Die Primermenge wurde auf 10 pmol pro Ansatz reduziert. Die Enzymkonzentration wurde um 4/5 auf 1 U verringert. Ferner wurde das Thermoprofil optimiert. Für die verwendeten Primer lag die optimale Anlagerungstemperatur bei 60 °C. Die Zykluszeiten konnten ohne Sensitivitätsverlust erheblich verringert werden. Dadurch verkürzt sich ein Zyklus von 3,5 auf 2 Minuten. Die erheblichen Modifikationen des PCR-Protokolls zum Nachweis von *F. tularensis* führte zu einer deutlichen Verbesserung der Spezifität (vgl. Kap 3.2.3.1.C) und Sensitivität. Im Kap. 3.1.13 ist das optimierte PCR-Protokoll dargestellt.

C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität

Die Spezifität der Primerkombination gegenüber unspezifischer DNA wurde durch den Einsatz von DNA einer Auswahl von Bakterien, Pilzen und Viren in die PCR getestet (Tabelle 3-4). Es handelte sich dabei um einen repräsentativen Querschnitt von Vertretern phylogenetisch eng verwandter Spezies sowie eine Auswahl weiterer heterologer Mikroorganismen. Zusätzlich wurde auch humane DNA eingesetzt. Insgesamt 12 verfügbare DNA-Matrizen der Spezies *Francisella tularensis* (vgl. Tabelle 3-2) wurden in die PCR eingesetzt, um die Spezifität des verwendeten Primerpaars Ft393/Ft642 zu prüfen. Die Amplifikationsreaktionen wurden entsprechend dem für diese Primerkombination im Originalprotokoll angegebenen Bedingungen sowie nach den optimierten Bedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.13). Die Visualisierung der Amplifikate erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (Kap. 3.1.11). In der PCR konnte mit der Primerkombination Ft393/Ft642 die DNA aller *F. tularensis* Isolate amplifiziert werden.

Bei Einsatz von DNA verwandter und heterologer Organismen in die PCR wurden in einigen Fällen falsch positive Signale beobachtet. Vor der Optimierung der PCR wurden auch diverse Amplifikate bei *F. novicida*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *S. typhimurium*, *Shigella boydii*, *Staph. aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Acinetobacter spp.*, *Arthrobacter spp.*, *B. cereus*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia carotovora*, *Listeria monocytogenes*, *Wolbachia persica* und *Rhodococcus spp.* beobachtet (ohne Abbildung).

Trotz Modifikation des PCR-Protokolls nach Long *et al.* (1993) konnten nicht alle unspezifischen PCR Produkte eliminiert werden. Als besonders problematisch anzusehen war die Amplifikation der nah verwandten Spezies *Francisella novicida*, einem tierpathogenen Keim der Risikogruppe L2. Unspezifische PCR Produkte wurden auch bei *Wolbachia persica* (ATCC VR 331), *Acinetobacter spp.* (DSM 590), *Legionella pneumophila* (ATCC 33153), *Staphylococcus aureus* (DSM 20231) und sporadisch HSV2 im Agarosegel beobachtet (vgl. Abb. 3-9).

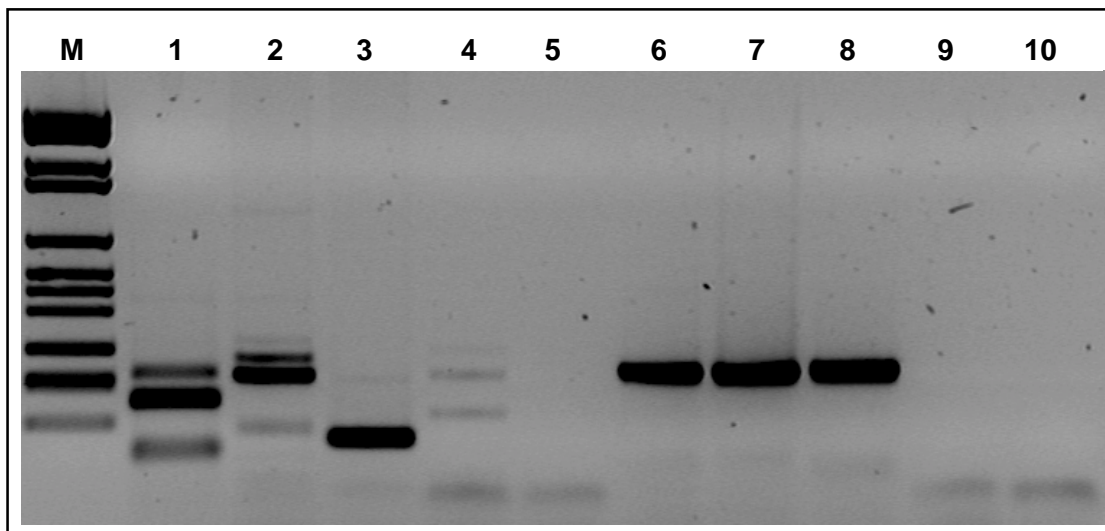


Abb. 3-9: Spezifität des *F. tularensis* PCR-Systems

Unter Verwendung des Primerpaares Ft393/Ft642 wurde die Amplifikation nach dem optimierten PCR Protokoll (Kap. 3.1.13) durchgeführt. Die Visualisierung der Amplifikate erfolgt nach gelelektrophoretischer Auftrennung (invertierte Abbildung).

Legende (Spuren von links nach rechts): **M**: Marker, **1**: *Wolbachia persica* (ATCC VR 331), **2**: *Acinetobacter* spp. (DSM 590), **3**: *L. pneumophila* (ATCC 33153), **4**: *Staph. aureus* (DSM 20231), **5**: HSV 2, **6**: *F. novicida* (F223), **7**: *F. tularensis* (F16), **8**: *F. tularensis* (F202), **9**: *F. philomiragia* (DSM 7535), **10**: Negativkontrolle

Zusammenfassend ist nach den hier gezeigten Ergebnissen festzuhalten, dass ein spezifischer und sicherer Nachweis von *Francisella tularensis* durch die PCR nach Long *et al.* (1993) nicht möglich war. Deshalb wurden weitere Primerpaare in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Ergebnisse dieser weiteren Spezifitätsprüfungen sind nachfolgend dargestellt.

D Alternative Primer-Systeme für *F. tularensis*

Über das PCR-System von Junhui *et al.* (1996) wird *F. tularensis* ebenfalls über einen Zielbereich des *TUL4* Gens nachgewiesen. Die PCR wurde wie im Originalprotokoll (Kap. 3.1.13.3) beschrieben mit drei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Mit der Primerkombination P1/P2 wurden biovar A und B von *Francisella tularensis* nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Bildung von Amplifikaten bei Verwendung von *Legionella pneumophila* Zellextrakt als DNA-Matrize beobachtet.

Unter Verwendung der Primerkombination P2/P3 konnten nach Gelelektrophorese ebenfalls Amplifikate von *Francisella tularensis* sowie *Legionella pneumophila* nachgewiesen werden.

Mit der Primerkombination P1/P4 (vgl. Abb. 3-10) wurde neben *F. tularensis* auch *Francisella novicida* nachgewiesen. Es waren nach gelelektrophoretischer Analyse ebenfalls Amplifikate bei *Legionella pneumophila* und *Acinetobacter* spp. zu beobachten.

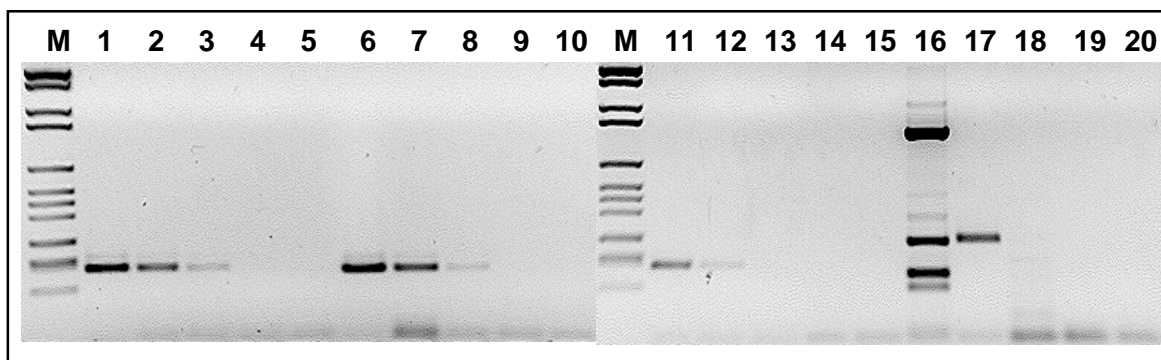


Abb. 3-10: Spezifität und Sensitivität der PCR nach Junhui *et al.* (1996)

Amplifikation verschiedener DNA-Matrizen unter Verwendung des Primerpaares P1/P4; Darstellung der Amplifikate nach gelelektrophoretischer Auftrennung (invertierte Abbildung); Legende (Spuren von links nach rechts): **M:** Marker, Spur 1 bis 5: *F. tularensis* (F16), 100 pg - 10 fg; Spur 6 bis 10: *F. tularensis* (Ft 202), 100 pg - 10 fg; **M:** Marker, Spur 11 bis 15: *F. novicida* (Ft 223), 100 pg - 10 fg; Spur 16: *Acinetobacter spp.* (DSM 590), Spur 17: *L. pneumophila* (ATCC 33153), Spur 18: *Staph. aureus* (DSM 20231), Spur 19: HSV 2, Spur 20: Negativkontrolle

Ein Abschnitt des *FopA* Gens ist bei der PCR nach Fulop *et al.* (1996) die Zielsequenz zum Nachweis von *F. tularensis*. Die PCR wurde gemäß dem Originalprotokoll (3.1.13.4) als nested PCR durchgeführt. Dabei wurden für 4 getestete heterologe Organismen (*Acinetobacter spp.* DSM 590, *L. pneumophila* ATCC 33153, *Staph. aureus* DSM 20231, HSV 2) keine Amplifikationsprodukte beobachtet, jedoch wurde auch *Francisella novicida* mit diesem PCR-System erfaßt.

Beide Systeme waren auf Grund mangelnder Spezifität sowie erhöhtem Arbeitsaufwand und Kontaminationsrisiko bei dem Einsatz einer nested PCR nach Fulop *et al.* (1996) ungeeignet, um das PCR-System von Long *et al.* (1993) bei der Etablierung des PCR-ELISA Nachweissystems für *Francisella tularensis* sinnvoll ersetzen zu können. Die erforderliche höhere Spezifität des Nachweissystems muß also über das DNA-Nachweisverfahren erbracht werden.

E Sensitivität

Unter Verwendung dekadischer Verdünnungsreihen genomischer DNA (1 ng – 1 fg) *F. tularensis* Stamm F16 als Matrize in der PCR wurde die Nachweisgrenze des optimierten PCR-Protokolls mit dem Primerpaar Ft393/Ft642-Dig im Agarosegel bestimmt.

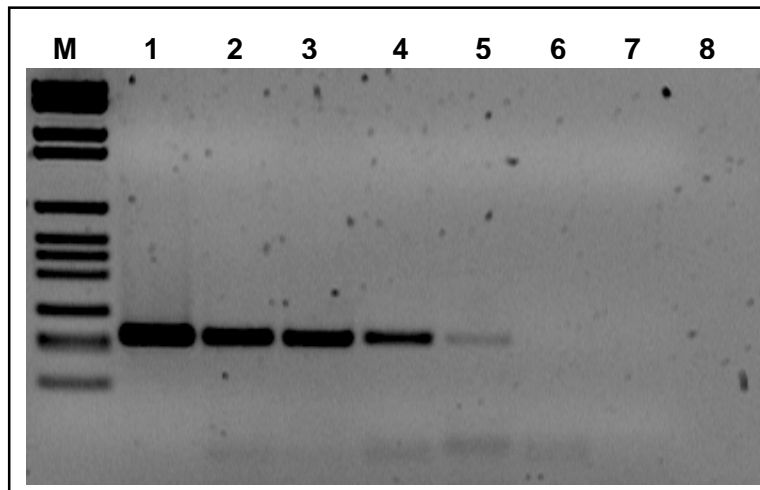


Abb. 3-11: Sensitivität des *Francisella tularensis* PCR-Systems

Amplifikation von $4,5 \times 10^5$ bis 0 Genomäquivalenten von *Francisella tularensis* (F16) mit der Primerkombination Ft393/Ft642 (Kap. 3.1.13). Invertierte Darstellung der Amplifikate nach gelelektrophoretischer Auftrennung;

Legende (Spuren von links nach rechts): **M**: Marker, Spur 1 bis 7: *F. tularensis* (F16), 1 ng bis 1 fg initial eingesetzte genomische DNA, Spur 8: Negativkontrolle

In Abb. 3-11 ist zu erkennen, dass *Francisella tularensis*- Amplifikationsprodukte nach initialem Einsatz von ≥ 100 fg bzw. ca. 50 GÄ *Francisella*-DNA in die PCR im Agarosegel detektierbar waren. Sehr starke Banden im Agarosegel erbrachte die Amplifikation von 1 ng – 1 pg an initial eingesetzter genomischer DNA von *Francisella tularensis* mit dem Primerpaar Ft393/Ft642-Dig. Die Amplifikation von 100 fg zeigte im Gel noch deutlich sichtbare Amplifikate. Bei geringeren Mengen eingesetzter DNA konnten keine Amplifikate im Gel beobachtet werden. Auch hier wurde bei Verwendung von dUTP statt dTTP keine Verringerung der Sensitivität der PCR beobachtet.

3.2.3.2 Etablierung des Nachweissystems für *F. tularensis* als PCR-ELISA

Neben der generellen Notwendigkeit eines spezifischen Nachweises von PCR-Produkten in Zusammenhang mit dem Nachweis von hochpathogenen Krankheitserregern ist bei diesem System zum Nachweis von *F. tularensis* eine grundsätzliche Verbesserung der Spezifität erforderlich. Wie in Abschnitt 3.2.3.1.C gezeigt wurde, ist der Nachweis von *F. tularensis* über PCR allein nicht ausreichend spezifisch. Durch den Einsatz einer spezifischen Fangsonde im PCR-ELISA könnte die angestrebte Spezifität erreicht werden.

A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte

Voraussetzung für das Design einer Fangsonde ist eine genaue Analyse der Amplifikatsequenzen. Dazu wurden die gereinigten Amplifikate der verfügbaren Isolate von *Francisella tularensis* und *F. novicida* sequenziert (Kap. 3.1.16.1B). Die erhaltenen Sequenzdaten bildeten die Basis für das Design der Sonden und die internen Kontroll-DNA's. Die Ergebnisse der Sequenzierungsarbeiten sind in der Form eines computergestützten Abgleichs aller für das jeweilige Detektionssystem erbrachten Sequenzdaten in ausführlicher Form im Anhang (Abb. 7-2) dargestellt.

B Design der Fangsonden

Aspekte, die bei der Konstruktion der Fangsonden Berücksichtigung fanden, wurden bereits unter Kapitel 2.4.5 bzw. 3.1.16 ausführlich erläutert. Die Analyse der Sequenzierungsdaten aller resultierenden *Francisella*-Amplifikate (250 bp) zeigte deutlich den extrem hohen Homologiegrad (ca. 99 %) von *F. novicida* (ATCC 15482) gegenüber *F. tularensis*. Für eine Differenzierung von *F. tularensis* und *F. novicida* unter Einsatz der Sondentechnologie bestand nur eine potentielle Möglichkeit. Hierzu wurde unter Nutzung von zwei der drei verstreut liegenden Punktmutationen eine Wildtyp-Sonde im Bereich von 131 bis 151 (vgl. Anhang) konstruiert. Die Abb. 3-12 zeigt einen Ausschnitt von 30 Basen (Sondenbereich 125 - 155) aus der DNA-Sequenz von *Francisella tularensis* bzw. *F. novicida*, sowie den über PCR-Mutagenese veränderten Sequenzbereich der Kontroll-DNA. Der Bereich der Fangsonden ist grau unterlegt, von der Wildtyp-Zielsequenz abweichende Basen sind fett gedruckt.

<i>F. tularensis</i>	5' TATATGTGAATATTTA AAAATAGGAGTATC 3'
<i>F. novicida</i>	5' TATATGTGAATAT GT TATAAAATAGGAGTATC 3'
Sondenbereich Wildtyp	5' TATATGTGAATATTTA AAAATAGGAGTATC 3'
Sondenbereich Standard	5' TATATTTTTTATCAAGACAATTAATTTAAGTATC 3'

Abb. 3-12: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs *Francisella tularensis*

C Überprüfung der Spezifität des ELISA-Systems

Zur Prüfung der Spezifität des Nachweises der einzelnen Erreger über das jeweilige PCR-ELISA System wurde die DNA aller verfügbaren spezifischen Isolate verwendet sowie DNA von heterologen Mikroorganismen.

Die spezifische Detektion von *Francisella tularensis* war allein durch PCR mit den getesteten Primerkombinationen nicht möglich. Wie in Abb. 3-9 in Kap. 3.2.3.1C gezeigt, wurde nach Optimierung der Amplifikationsbedingungen neben *F. tularensis* noch *Wolbachia persica*, *Acinetobacter spp.*, *L. pneumophila*, *Staph. aureus* und *F. novicida* im Agarosegel nachgewiesen. Unter Verwendung der in Kap. 3.2.3.2B dargestellten Wildtyp-Sonde wurde nur *F. tularensis* spezifisch nachgewiesen (vgl. Tabelle 3-27). Trotz des großen Homologiegrades der Sequenzen von *F. tularensis* und *F. novicida* von ca. 99 % konnte über die verwendete Wildtyp-Sonde (Ft-1-bio) der Nachweis von *F. novicida* im ELISA ausgeschlossen werden. Damit weist der etablierte PCR-ELISA für *F. tularensis* eine deutlich höhere Spezifität gegenüber der konventionellen PCR auf.

Tabelle 3-27: Vergleich der Nachweismethoden

Spezies		Nachweismethode	
		PCR + Agarose- gelelektrophorese	PCR- ELISA
<i>F. tularensis</i>	F16	+	+
<i>F. tularensis</i>	F202	+	+
<i>F. novicida</i>	F223	+	-
<i>F. philomiragia</i>	DSM 7535	-	-
<i>Wolbachia persica</i>	ATCC VR 331	+	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	DSM 590	+	-
<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33153	+	-
<i>Staph. aureus</i>	DSM 20231	+	-

Unter Verwendung des Primerpaares Ft393/Ft642 wurde die Amplifikation nach dem optimierten PCR Protokoll (Kap. 3.1.13) durchgeführt. Die Detektion der Amplifikate erfolgte durch Visualisierung nach gelelektrophoretischer Auftrennung und kolorimetrisch nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) unter Verwendung der Wildtyp-Sonde Ft-1-bio.

D Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Für den Nachweis der jeweiligen spezifischen Amplifikate galt es die Konditionen zu finden, welche einerseits stringent genug sind, um die geforderte Spezifität zu gewährleisten, andererseits die Ausbildung stabiler Hybride erlauben. In der Regel wird von einer Hybridisierungstemperatur ausgegangen, die 5 – 10 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur der Sonde liegt (Sambrook *et al.* 1989). Da Hybride zwischen Oligonukleotiden und Ziel-DNA unter den beschriebenen Bedingungen leicht reversibel sind, sollten die Waschschrte nach der Hybridisierung so gewählt werden, das es nicht zu einer Dissoziation kommt. Die Variation von Konzentration der Wildtyp-Fangsonde sowie der Salzkonzentration im Waschpuffer hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Detektion von *F. tularensis* mittels PCR-ELISA. Zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur wurden Hybridisierungen bei 37 und 45 °C durchgeführt. Die verwendeten Temperaturen orientieren sich an den Schmelztemperaturen der eingesetzten Sonden (vgl. Kap. 3.1.13). Abbildung 3-13 zeigt die Ergebnisse.

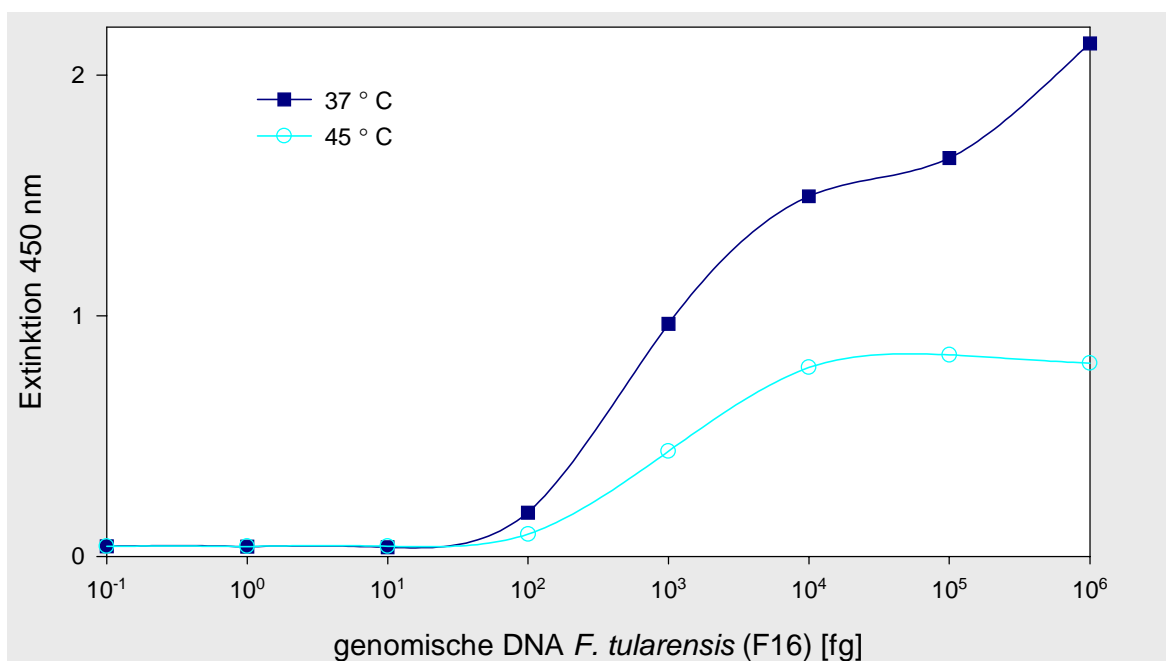


Abb. 3-13: Variation der Hybridisierungstemperatur

Nachweis von *F. tularensis* Amplifikaten nach dem Prinzip des ELISA

Die Amplifikation wurde mit der Primerkombination Ft393/Ft642-Dig und dekadischen Verdünnungen von 100 ag bis 1 ng gereinigter genomischer DNA (*F. tularensis* F 16) durchgeführt. Der Nachweis der 1:10 verdünnten PCR-Produkte wurde kolorimetrisch nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) durch Messung der Extinktion bei 450 nm gegen 650 nm durchgeführt.

Im Vergleich zu den für die Hybridisierung bei 37 °C erhaltenen Extinktionen werden bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C deutlich geringere Werte erhalten. Die Extinktionswerte liegen hier auch für hohe DNA-Konzentrationen noch unter 1,0. Diese Werte sind für eine eindeutige Detektion zu gering, also ist eine Hybridisierungstemperatur von 45 °C bereits zu stringent für den Nachweis von *F. tularensis*. Für nachfolgende Untersuchungen wurde deshalb als Hybridisierungstemperatur 37 °C verwendet. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass die nachfolgende Inkubation der Hybridisierungsprodukte mit dem Antikörper generell ebenfalls bei 37 °C erfolgt, und der Versuchsablauf dadurch vereinfacht werden konnte. Tabelle 3-28 faßt die Ergebnisse der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zusammen.

Tabelle 3-28: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von *F. tularensis* nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2)

<i>Francisella tularensis</i>	
Hybridisierungstemperatur	37 °C
Inkubationszeit Hybridisierung	30 Minuten
Salzkonzentration Hybridisierungspuffer	2,5 x SSC
Salzkonzentration Waschpuffer 1	1,0 x SSC
Wildtyp-Fangsonde	1,5 pmol pro Kavität
Standard-Sonde	1,5 pmol pro Kavität
Verdünnung des Antikörper	1:3000

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis von *F. tularensis* nach dem Prinzip des ELISA zusammen. Der ELISA wird im Anschluß an die jeweilige PCR als Spezifitätskontrolle zur Detektion der spezifischen Amplifikate mittels einer enzymatischen Farbreaktion im Mikrotiterplattenformat eingesetzt.

E Nachweisgrenzen der PCR-ELISA Systeme („cut-off“)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde wie in Kap. 3.1.16.2G beschrieben eine dekadische Verdünnungsreihe der jeweiligen genomischen DNA amplifiziert und die PCR Produkte im ELISA detektiert. Im Anschluß an die Detektion der PCR Produkte erfolgte die Festlegung der Nachweisgrenze für den kolorimetrischen DNA-Nachweis mittels PCR-ELISA durch die Berechnung des „cut-off“ Wertes aus dem Mittelwert der Negativkontrollen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung. Die angegebenen Nachweisgrenzen beziehen sich jeweils auf die initial in die PCR eingesetzten DNA-Mengen.

Die Sensitivität des kolorimetrischen Nachweises in der Mikrotiterplatte nach Amplifikation von genomischer *F. tularensis* DNA ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

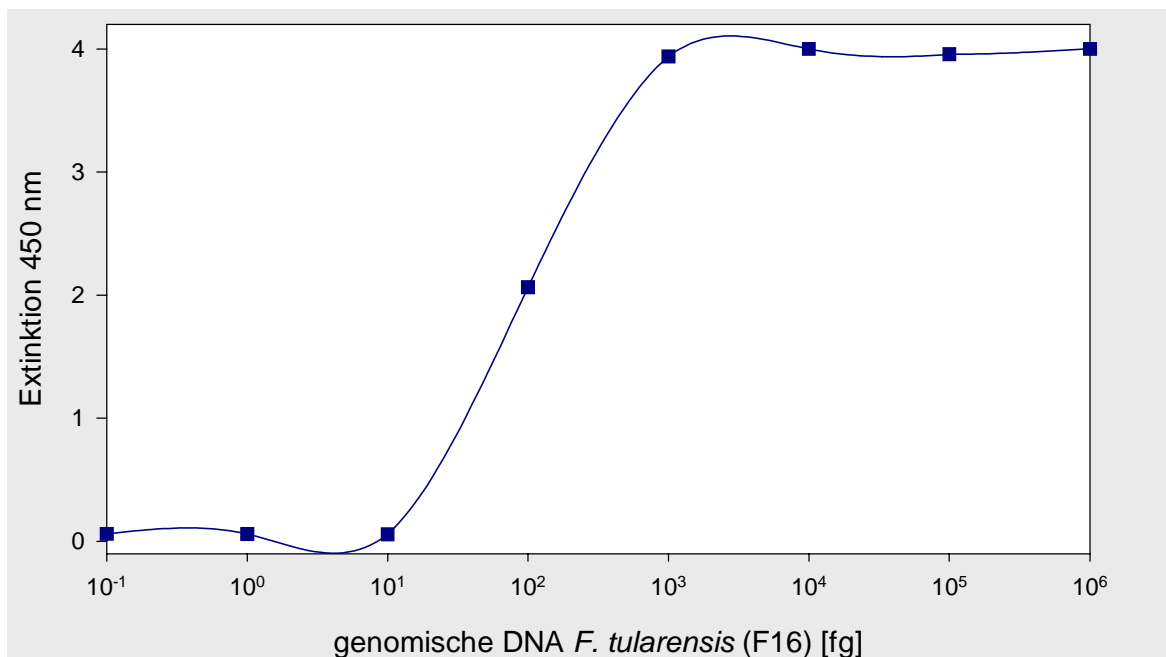


Abb. 3-14: Bestimmung der Nachweisgrenze für den *F. tularensis* PCR-ELISA

Die Amplifikation von 100 ag bis 1 ng genomischer *Francisella tularensis*-DNA (F16) erfolgte mit der Primerkombination Ft393/Ft642-Dig (Kap. 3.1.13). Anschließend wurden die Amplifikate kolorimetrisch nach dem Prinzip des ELISA detektiert.

Beim kolorimetrischen Nachweis mittels PCR-ELISA (Kap. 3.1.16.2) wurde nach einer 15-minütigen Entwicklungszeit der Farbreaktion Extinktionen von 2,06 bis 4,0 gemessen (Abb. 3-14).

Als „cut-off“ Wert wurde eine Extinktion ($OD_{450\text{ nm}}$) von 0,080 berechnet. Unter Berücksichtigung dieses Wertes liegt die Nachweisgrenze für dieses Detektionssystem somit im Bereich von 10 bis 50 Genomäquivalenten, die in eine Amplifikationsreaktion mindestens eingesetzt werden müssen.

Der Nachweis von *F. tularensis* Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA ist in den durchgeführten Untersuchungen jeweils mit einer Nachweisgrenze von ca. 100 fg bzw. 50 GÄ möglich. Insgesamt ermöglicht jedoch erst der PCR-ELISA den spezifischen Nachweis von *F. tularensis*. Nur über die Anwendung der Sondentechnologie unter Verwendung der WT-Sonde FT-1-bio können alle unspezifischen und somit falsch positiven Signale, wie sie z.B. für *F. novicida* im Agarosegel beobachtet wurden, ausgeschlossen werden. Der PCR-ELISA weist damit gegenüber einer klassischen PCR mit Nachweis der Amplifikate im Gel eine deutlich höhere Spezifität auf.

3.2.3.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle

Die Verwendung eines internen Standards (Kontroll-DNA) als Amplifikationskontrolle wird von verschiedenen Arbeitsgruppen (vgl. Kap. 2.4.3) als zuverlässige Methode beschrieben, um falsch negative PCR-Resultate auszuschließen.

A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit kommt ein interner Standard in Form einer von der Ziel-DNA abgeleiteten Sequenz (Kontroll-DNA) zum Einsatz. Die Kontroll-DNA wird dem jeweiligen Reaktionsansatz in definierter Konzentration zugesetzt und stets parallel zu der möglicherweise in der Probe vorhandenen Wildtyp-DNA amplifiziert.

Auf der Grundlage des wie in Kapitel 3.1.16.1B beschrieben erstellten Abgleichs der Amplifikatsequenzen wurde für das jeweilige Nachweissystem durch eine PCR *in vitro* Mutagenese eine interne Kontroll-DNA hergestellt (Kap. 3.1.17.1). Durch diese Substitutionsmutation wurde der zur Wildtyp-Fangsonde komplementäre Sequenzbereich gegen den zu der Standard-Sonde komplementären Sequenzabschnitt ausgetauscht. Die für das *F. tularensis* Nachweissystem verwendeten Primer sind in Kapitel 3.1.13 aufgelistet. Das so entstandene Kontroll-DNA Fragmente *F. tularensis* ST-DNA hat eine Länge von 989 bp. Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten Kontroll-DNA erfolgte photometrisch nach Durchführung einer präparativen Gelelektrophorese und anschließender Elution der PCR-Produkte aus der Agarose mittels Extraktions-Kit (Kap. 3.1.16.1A). Die Korrektheit der Sequenz jeder einzelnen Kontroll-DNA wurde mittels Sequenzierung (Kap. 3.1.16.1B) überprüft.

B Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA

Eine dekadische Verdünnungsreihe der Wildtyp- und Standard-DNA wurde in einer PCR (3.1.13) amplifiziert. Die Auswertung erfolgte über Gelelektrophorese (3.1.11) sowie durch Hybridisierung der Amplifikate in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten entsprechend den in Tabelle 3-28 definierten Bedingungen.

Für die Detektion von *F. tularensis* waren in der PCR wie auch im ELISA jeweils vergleichbare Kopienzahlen an initial in die PCR eingesetzter Wildtyp- bzw. Kontroll-DNA nachweisbar. Unabhängig von der Methode des Nachweises der Amplifikate wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Die Abweichungen in der Zahl der amplifizierbaren Kopien Wildtyp- gegenüber interner Kontroll-DNA war kleiner Faktor 10. Die Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA weist damit keinen wesentlichen Unterschied auf.

C Interner Standard als Amplifikationskontrolle

Der Zusatz einer Kontroll-DNA als internen Standard in die PCR dient der Überprüfung der Amplifizierbarkeit der potentiell in der Probe vorhandenen Ziel-DNA. Die Konzentration der in die PCR eingesetzten internen Kontroll-DNA ist so zu wählen, dass bei Abwesenheit von Ziel-DNA in einer Probe die zugesetzte Kontroll-DNA amplifiziert wird und eine eindeutige Extinktion im ELISA liefert. Bei Anwesenheit von Ziel-DNA soll die Amplifikation in der kompetitiv verlaufenden PCR zugunsten der nachzuweisenden Erreger-DNA erfolgen. Um dies zu gewährleisten, werden kompetitive Amplifikationsreaktionen mit verschiedenen Konzentrationen interner Kontroll-DNA und einer dekadischen Verdünnungsreihe Wildtyp-DNA durchgeführt. Der Einsatz von interner Kontroll-DNA erfolgt in Konzentrationen von 1 ag bis maximal 1,0 fg. Genomische Wildtyp-DNA wurde im Konzentrationsbereich von 100 ag bis 1 ng verwendet. Als Kontrollen dienen Reaktionen mit entweder Wildtyp- oder Kontroll-DNA allein. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für das *F. tularensis* Nachweissysteme.

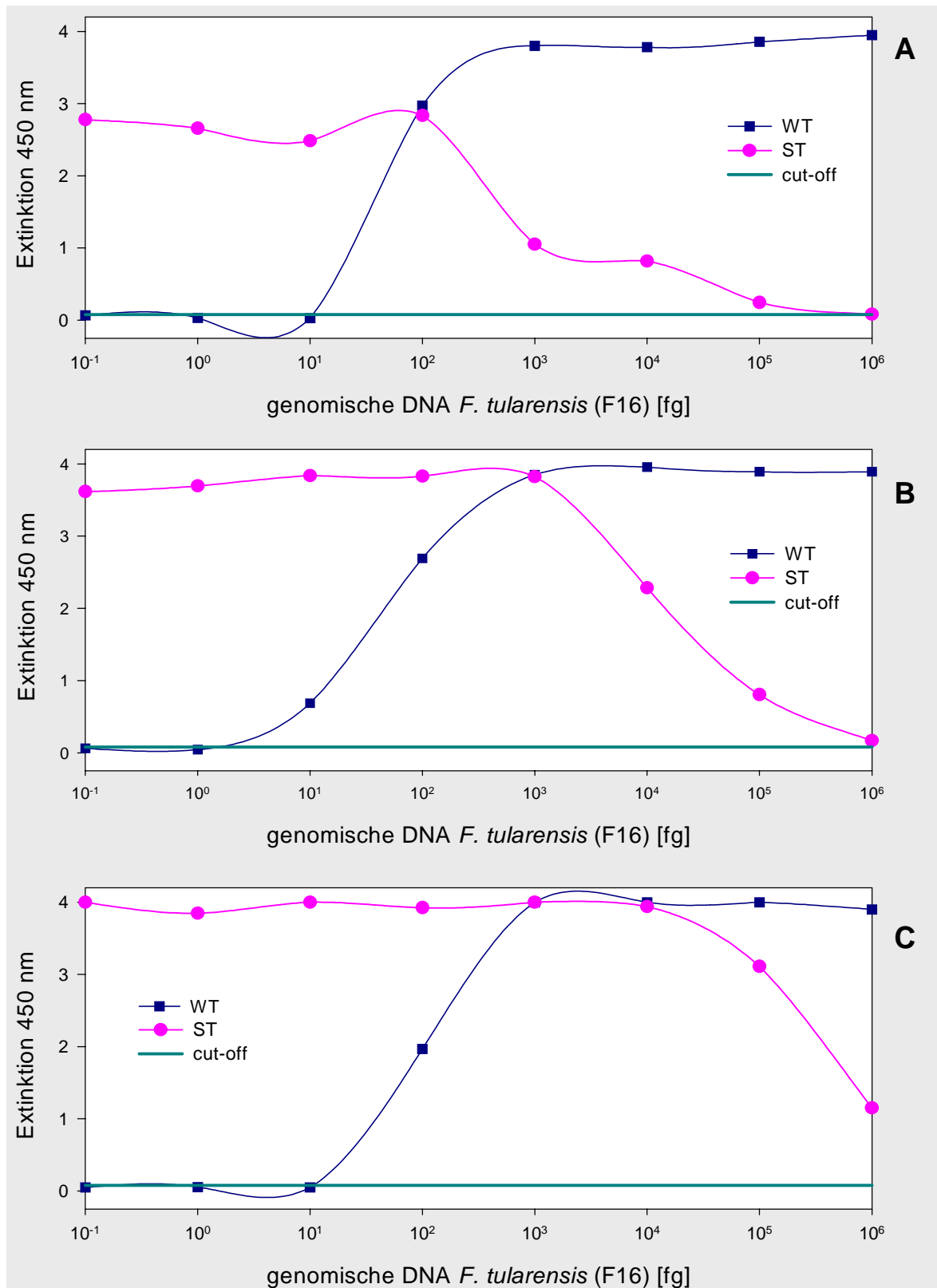


Abb. 3-15: Nachweis von *F. tularensis* Amplifikaten nach kompetitiver PCR

Amplifikation von 100 ag bis 1 ng genomischer DNA *F. tularensis* (F 16) mit der Primerkombination Ft393/FT642-Dig in Gegenwart von je 2,5 ag (Grafik A), 10 ag (Grafik B) bzw. 100 ag (Grafik C) Kontroll-DNA. Der Nachweis der Amplifikate erfolgte kolorimetrisch nach Hybridisierung der Amplifikate mit den spezifischen biotinylierten Fangsonden (WT bzw. ST).

Der Nachweis von 100 fg bis 1 ng *F. tularensis* DNA wurde durch den Zusatz von 0,0025 fg bzw. 0,01 fg Kontroll-DNA nicht beeinträchtigt (Abb. 3-15 A und 3-15 B). In beiden Fällen kann auch bei Einsatz von 10 bis 100 fg in die PCR noch eine meßbare Extinktion ermittelt werden. Diese Werte sind vergleichbar mit der für das PCR-System ermittelten Sensitivität (Abb. 3-11 bzw. Abb. 3-14). Erst durch den Zusatz von 0,1 fg Kontroll-DNA wird die Amplifikation von *Francisella tularensis* DNA beeinträchtigt. Infolge der Konkurrenz sind die gemessenen Extinktionswerte einer PCR mit < 1 pg deutlich geringer (Abb. 3-15 C).

Bei der Betrachtung der Extinktionswerte für die Kontroll-DNA waren die Werte bei Verwendung von 1 ag generell niedrig und für den Einsatz als Amplifikationskontrolle nur bedingt geeignet (Abb. 3-15 A). Auch der Einsatz von 0,1 fg ist auf Grund der auftretenden Konkurrenz des Wildtyp-Signals nicht als Amplifikationskontrolle geeignet (Abb. 3-15 C). Die Amplifikationsreaktionen mit 0,01 fg Kontroll-DNA ergibt dagegen eindeutige Extinktionswerte, ohne eine Konkurrenz der Amplifikation von Wildtyp-DNA zu bewirken (Abb. 3-15 B). Diese Menge an Kontroll-DNA ist somit als Amplifikationskontrolle geeignet. Sie gewährleistet maximale Sensitivität für den Nachweis von *F. tularensis* bei eindeutigen Extinktionswerten für die interne Kontroll-DNA.

3.2.4 ENTWICKLUNG EINES NACHWEISVERFAHRENS FÜR ORTHOPOCKENVIREN

3.2.4.1 PCR-System

Die Entwicklung des Genus spezifischen Nachweissystems für Orthopockenviren basiert auf die PCR. Dabei wird soweit möglich auf bereits bestehende PCR-Systeme zurückgegriffen. Eine Übersicht über bereits etablierte PCR-Systeme gibt die Tabelle 2-3.

A Auswahl der Primer

Die Enden des Zielfragments einer PCR sind durch die 5'-Enden der Primer definiert, welche als Starthilfe für die gezielte Amplifikation von DNA zum Nachweis der Krankheitserreger benötigt werden.

Die Sequenz des „A-type inclusion body“ Proteins (*ATI*) ist Zielbereich zum Spezies spezifischen Nachweis von Orthopockenviren mittels PCR. Das Hemagglutinin (*HA*) Gen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen als Consensussequenz zum Nachweis der Orthopockenviren beschrieben. Für das im Rahmen dieser Arbeit zu etablierende Genus spezifische Nachweissystem für Orthopockenviren wurde die Consensus Primer-kombination 14-up/14-low mit einer Zielsequenz im Bereich des 14 kDa Fusionsproteins ausgewählt. Die Sequenz dieses Proteins wurde von Meyer *et al.* (1994) beschrieben. Auf Grund des hoch konservierten Sequenzbereiches resultieren Amplifikationen in identische DNA-Fragmente von 280 bp für alle Spezies außer Raccoon- (Waschbär) und Vole Poxvirus (Wühlmaus). Dort werden etwas größere Fragmente (bis 312 bp) amplifiziert. Unter Verwendung von Skunk Poxvirus (Stinktief) DNA wird mit dem Primerpaar 14-up/14-low kein Amplifikat erzielt (Meyer, 1998, pers. comm.).

B Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen

Ausgehend von dem Originalprotokoll nach Meyer (1998, pers. commun.) wurde das PCR-System entsprechend den in Kap. 3.1.15 beschriebenen Schritten optimiert. Das PCR-Protokoll zum Nachweis von Orthopockenviren wurde erheblich modifiziert, und damit die Sensitivität des Nachweises deutlich verbessert. Die Konzentration an Magnesiumchlorid im PCR Ansatz wurde von 1,5 auf 2,0 mM erhöht. Die optimale DNA Polymerase Konzentration beträgt 1 U pro Ansatz. Die Primerkonzentration wurde auf 5 pmol je Primer pro Ansatz eingestellt. Die optimale Anlagerungstemperatur für die verwendeten Primer 14-up/14-low beträgt 63 °C. Die Zykluszeiten konnten ohne Sensitivitätsverlust von jeweils einer Minute auf 40 bzw.

45 Sekunden reduziert werden. Damit sinkt die benötigte Zeit für einen Reaktionszyklus von 3 Minuten auf 2 min. 5 sec. Im Kap. 3.1.14 ist das optimierte PCR-Protokoll dargestellt.

C Prüfung der PCR-Primer auf Ihre Spezifität

Zur Prüfung der Spezifität des für das jeweilige Nachweissystem ausgewählten Primerpaars wurde die DNA von verschiedenen Spezies / Isolaten eingesetzt. Die Spezifität der jeweiligen Primerkombination gegenüber unspezifischer DNA wurde durch den Einsatz von DNA einer Auswahl von Bakterien, Pilzen und Viren in der PCR getestet (Tabelle 3-4). Zusätzlich wurde auch humane DNA eingesetzt. Der Nachweis der Amplifizierbarkeit der mittels alkalischer Lyse (Kap. 3.1.7.1) isolierten DNA wurde unter Verwendung von allgemeinen Primern (Tabelle 3-7) belegt. Die in dieser PCR mitgeführten Negativkontrollen ergaben in der Gelelektrophorese keine Signale.

Die Spezifität des Primerpaars 14up/14-low (Tab. 3-20) wurde unter Verwendung der DNA von 8 verschiedenen Orthopockenviren Isolaten getestet. Die PCR-Reaktionen wurden entsprechend den für die Primerkombination optimierten Bedingungen durchgeführt (Kap. 3.1.14). Die Darstellung der PCR Produkte erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (Kap. 3.1.11). Mit der genannten Primerkombination konnte die Zielsequenz aller 8 in die Untersuchung einbezogenen Orthopockenviren DNA-Isolate in der PCR amplifiziert werden.

Zur Prüfung der Spezifität der Primerkombination gegenüber anderen DNA-Matrizen wurden Präparationen einer Auswahl von Bakterien, Pilzen und Viren sowie humane DNA in die PCR eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der resultierenden PCR Produkte konnte bei keiner der getesteten DNA-Matrizen ein falsch positives Signal beobachtet werden. Die erhaltenen Daten zeigen, dass mit dem verwendeten Orthopockenviren PCR-System mögliche Begleitflora bzw. Begleit-DNA sicher ausgegrenzt werden konnte.

D Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität des Orthopockenviren PCR-Systems wird genomische DNA als Matrize in dekadischer Verdünnung in die PCR unter Verwendung der Primer 14-up-Dig/14-low eingesetzt. Die Sensitivität der PCR ist durch Auftrennung der 280 bp langen spezifischen Amplifikate im Agarosegel dargestellt.

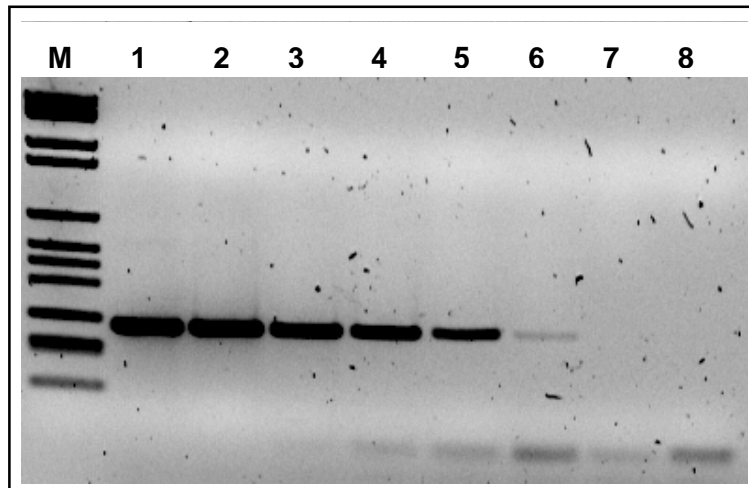


Abb. 3-16: Sensitivität des Orthopockenviren PCR-Systems

Amplifikation von 5×10^6 bis 0 Genomäquivalenten von Orthopockenviren mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low (Kap. 3.1.14). Invertierte Darstellung der Amplifikate nach gelelektrophoretischer Auftrennung;

Legende (Spuren von links nach rechts): **M**: Marker, Spur 1 bis 7: Büffelpocken Virus (OP1), 1 ng bis 1 fg initial eingesetzte genomische DNA, Spur 8: Negativkontrolle

Abbildung 3-16 zeigt, dass Amplifikationsprodukte bis ≥ 10 fg (OP 1) an Orthopockenviren-DNA im Gel detektierbar waren. Dies entspricht theoretisch ca. 50 Genomäquivalenten. Dabei erbrachte die Amplifikation von 1 ng – 100 fg Orthopockenviren-DNA mit dem Primerpaar 14-up-Dig/14-low im Agarosegel sehr intensive Banden. Der Einsatz von 10 fg DNA zeigte noch deutliche Mengen an Amplifikationsprodukt. Geringere Mengen an initial eingesetzter DNA konnten im Agarosegel nicht detektiert werden. Die Verwendung von dUTP anstatt von dTTP wirkte sich nicht auf die Sensitivität des PCR-Systems aus.

3.2.4.2 Etablierung des Nachweissystems als PCR-ELISA

Durch die Detektion von PCR Produkten mittels ELISA wird im Gegensatz zur Analyse mittels Gelelektrophorese ein spezifischer Nachweis zur Verifikation der Amplifikate geführt. Zu diesem Zweck werden DNA Fangsonden verwendet, die spezifisch mit dem PCR Produkt (markierter Einzelstrang) hybridisieren und so eine eindeutige Detektion ermöglichen.

A Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte

Voraussetzung für das Design der Fangsonden ist eine genaue Analyse der Amplifikatsequenzen. Dazu wurden die gereinigten Amplifikate der verfügbaren Isolate der Orthopockenviren sequenziert (Kap. 3.1.16.1B). Die erhaltenen Sequenzdaten sowie freundlicherweise von PD Dr. H. Meyer aus München zur Verfügung gestellte Daten bildeten die Basis für das Design der Sonden und der internen Kontroll-DNA. Die Ergebnisse sind in der Form eines computergestützten Abgleichs aller für das jeweilige Detektionssystem erbrachten Sequenzdaten in ausführlicher Form im Anhang (Abb. 7-3) dargestellt.

B Design der Fangsonden

Eine möglichst geringe Abweichung in der Länge der Amplifikate gewährleistet in der kompetitiven PCR eine vergleichbar hohe Amplifikationseffizienz. Eine Unterscheidung der Amplifikate von Wildtyp- (Ziel-DNA) und interner Kontroll-DNA im Agarosegel ist mangels ausreichendem Größenunterschied dann nicht mehr möglich. Der spezifische Nachweis der Wildtyp- (WT) und Kontroll-DNA (ST) Amplifikate wurde deshalb ausschließlich mit Hilfe spezifischer biotinylierter Fangsonden in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Aspekte, die bei der Konstruktion der Fangsonden Berücksichtigung fanden, sind einerseits die Schmelzpunkte (T_m), die für beide Oligonukleotide möglichst gleich sein sollte. Andererseits sollte die Ausbildung von Sekundärstrukturen möglichst vermieden werden. Die Überprüfung dieser Parameter erfolgte mit Hilfe des Programms DNASTAR[®] Version 4.0. Ebenso sollte sich der GC-Gehalt im Hybridisierungsbereich der entsprechenden Fangsonden möglichst nicht voneinander unterscheiden, damit identische Hybridisierungsbedingungen für Wildtyp- und Standard- Fangsonden gegeben sind.

Aus den Arbeiten von Meyer *et al.* (1998, pers. communication) sind Amplifikat-Sequenzen von 27 Orthopockenviren Isolaten bekannt. Der erstellte Sequenzvergleich zeigte eine breite Variabilität innerhalb dieser Gruppe der Orthopockenviren auf. Als ein potentiell geeigneter Sondenbereich wurde ein Bereich ausgewählt (von Base 280 bis 302, vgl. Anhang, Abb. 7-3), bei dem auf Basis vorhandener Daten 4 verschiedene Sonden notwendig waren, um alle im Sequenzvergleich enthaltenen Spezies / Isolate nachweisen zu können. Auf der Ebene der Proteinsequenz zeigen diese 4 Sonden keine Abweichungen. Abb. 3-17 zeigt, dass die ausgewählten Sonden sich um bis zu 5 Basen in der DNA-Sequenz unterscheiden (Sondenbereich antisense, 310 – 269).

OP1 5' GAGTTTCAGCGTGATTTTCCAACCTAAATAGAACTTCATC 3'
 OP2 5' GAGTTTCAGCATGATTTTCCAACCTAAATAGAACTTCATC 3'
 OP3 5' GTGTTTCGGCATGATTTTCCAGTCTGAATAAACTTCATC 3'
 OP4 5' GAGTTTCAGCGTGATTTTCCAGTCTGAATAGCACTTCATC 3'
 OP-Kontroll-DNA 5' GAGTTTCA**GACTACGGAATTCCGCTGTCC**ACTTCATC 3'

Abb. 3-17: Sequenzausschnitt des Sondenbereichs Orthopockenviren

Fett gedruckte Basen zeigen eine Abweichung der Basensequenz im Vergleich zur Sequenz OP1

C Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Für den Nachweis der jeweiligen spezifischen Amplifikate galt es die Konditionen zu finden, welche einerseits stringent genug sind, um die geforderte Spezifität zu gewährleisten, andererseits die Ausbildung stabiler Hybride erlauben. In der Regel wird von einer Hybridisierungstemperatur ausgegangen, die 5 – 10 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur der Sonde liegt (Sambrook *et al.* 1989). Da Hybride zwischen Oligonukleotiden und Ziel-DNA unter den beschriebenen Bedingungen leicht reversibel sind, sollten die Waschschrte nach der Hybridisierung so gewählt werden, das es nicht zu einer Dissoziation kommt. Die Optimierung der Hybridisierung erfolgte nach den in Kap. 3.1.16.2E beschriebenen Schritten. Im Folgenden werden exemplarisch einige Schritte der Optimierung dargestellt.

Zur Ermittlung der optimalen Einsatzmenge von Fangsonden für das Orthopockenviren Nachweissystem wird eine Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Mengen (0,3 pmol, 0,75 pmol oder 1,1 pmol pro Kavität) beschichtet. Hybridisierung und Detektion der Amplifikate erfolgt entsprechend den in Kapitel 3.1.16.2 bzw. Tabelle 3-29 beschriebenen Bedingungen. Die gemessenen Extinktionen nach einer 15-minütigen Entwicklungszeit der Farbreaktion sind in Abb. 3-18 dargestellt.

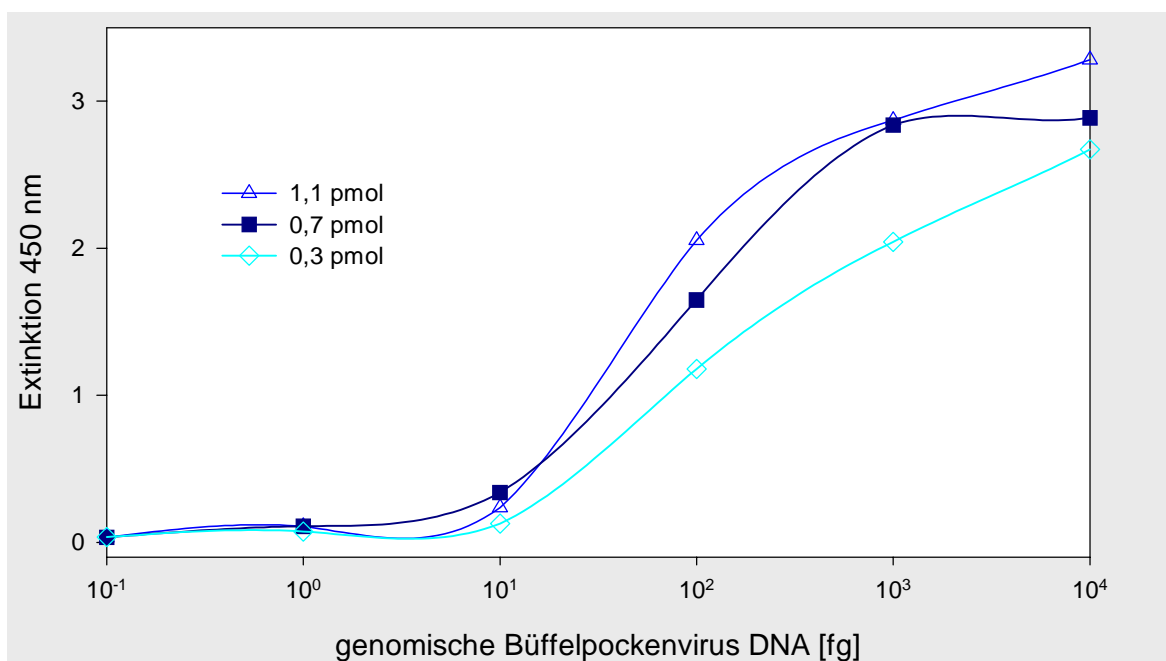


Abb. 3-18: Variation der Einsatzmenge an Fangsonde

Nachweis von Orthopockenviren DNA nach dem Prinzip des ELISA

Die Amplifikation wurde mit dekadischen Verdünnungen von 100 ag bis 100 pg gereinigter genomischer DNA (OP1) und der Primerkombination 14-up-Dig/14-low durchgeführt. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte erfolgt mit 0,3 pmol, 0,75 pmol und 1,1 pmol je Kavität biotinylierter Fangsonde OP-1-bio und OP-2-bio. Die 1:10 verdünnten Amplifikate (280 bp) werden nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) kolorimetrisch nachgewiesen. Gemessen wird die Extinktion bei 450 nm gegen 650 nm.

Die höchsten Extinktionswerte wurden bei einer Beschichtung mit 1,1 pmol Fangsonde pro Kavität erzielt. Sowohl die Beschichtung mit 0,75 und 0,3 pmol Fangsonde pro Kavität ergab überwiegend niedrigere Extinktionswerte. Für die Detektion von geringen Mengen an Ziel-DNA (10 fg) erbrachte die Beschichtung mit 0,75 pmol den höchsten Extinktionswert. Für nachfolgende Untersuchungen wird eine Wildtyp-Sondenkonzentration von 0,75 pmol je Sonde (OP1-bio bis OP4-bio) verwendet (vgl. Tabelle 3-29), da mit dieser Sondenkonzentration einerseits deutlich höhere Extinktionen erzielt werden können als mit einer Konzentration von 0,3 pmol. Andererseits wird im Vergleich zu der gewählten Standard-Sondenkonzentration von 1,5 pmol keine überproportional hohe Sondenkonzentration eingesetzt. Unterteilt man die vier verwendeten Wildtyp-Sonden in zwei Gruppen mit je zwei Sonden, die die mögliche unterschiedliche Amplifikatlänge widerspiegeln (OP1-bio + OP2-bio für Amplifikate der Länge 280 bp bzw. OP3-bio + OP4-bio für 312 bp lange Amplifikate), so ist bezogen auf diese Gruppen die Konzentration von Wildtyp- und Standard-Sonde identisch.

Zusammenfassend sind die optimierten Bedingungen für den kolorimetrischen Nachweis von Amplifikaten in der Mikrotiterplatte für die verschiedenen Erreger in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 3-29: Hybridisierungsbedingungen zum kolorimetrischen Nachweis von Orthopockenviren nach dem Prinzip des ELISA

Orthopockenviren	
Hybridisierungstemperatur	50 °C
Inkubationszeit Hybridisierung	30 Minuten
Salzkonzentration Hybridisierungspuffer	2,5 x SSC
Salzkonzentration Waschpuffer 1	1,0 x SSC
Wildtyp-Fangsonden 1-4 je	0,75 pmol pro Kavität
Standard-Sonde	1,5 pmol pro Kavität
Verdünnung des Antikörpers	1:3000

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis der Orthopockenviren nach dem Prinzip des ELISA zusammen. Der ELISA wird im Anschluß an die jeweilige PCR als Spezifitätskontrolle zur Detektion der spezifischen Amplifikate mittels einer enzymatischen Farbreaktion im Mikrotiterplattenformat eingesetzt.

D Nachweisgrenzen des PCR-ELISA Systems („cut-off“)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde wie in Kap. 3.1.16.2G beschrieben eine dekadische Verdünnungsreihe der jeweiligen genomischen DNA amplifiziert und die PCR Produkte im ELISA detektiert. Im Anschluß an die Detektion der PCR Produkte erfolgte die Festlegung der Nachweisgrenze für den kolorimetrischen DNA-Nachweis mittels PCR-ELISA durch die Berechnung des „cut-off“ Wertes aus dem Mittelwert der Negativkontrollen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung. Die angegebenen Nachweisgrenzen beziehen sich jeweils auf die initial in die PCR eingesetzten DNA-Mengen.

Abbildung 3-19 zeigt den kolorimetrischen Nachweis der Amplifikationsprodukte. Beim kolorimetrischen Nachweis von Amplifikaten mittels PCR-ELISA (Kap. 3.1.16.2) wurden Extinktionen im Bereich von 1,3 bis 4,0 gemessen. Dabei war bei DNA-Konzentrationen > 100 fg eine Abnahme der gemessenen Extinktion zu beobachten. Die Verringerung der Extinktionswerte resultiert möglicherweise aus einer vorzeitigen Renaturierung der Amplifikate, bevor ein Hybridisierungsereignis stattfinden konnte.

Als „cut-off“ Wert wurde eine Extinktion von 0,073 ermittelt. Unter Berücksichtigung dieses Wertes ergibt sich für dieses Detektionssystem eine theoretische Nachweisgrenze im Bereich von 10 bis 50 Genomäquivalenten.

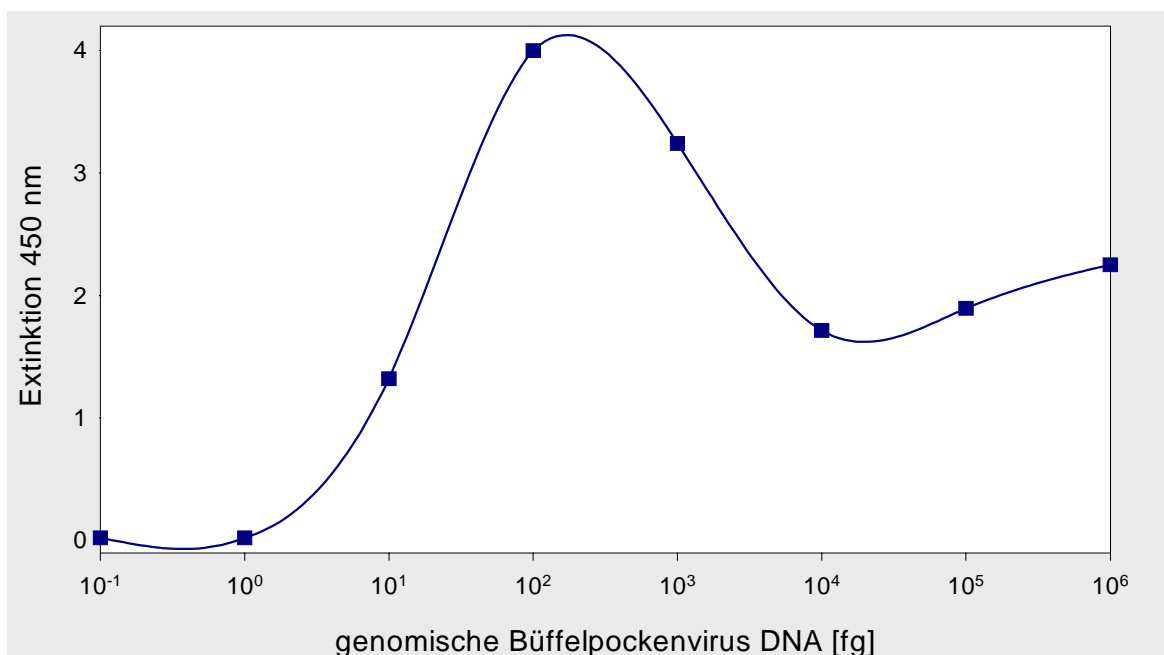


Abb. 3-19: Sensitivität des Orthopockenviren PCR-ELISA Systems

Kolorimetrischer Nachweis von Amplifikaten nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) in einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung von dem Primerpaar 14-up-Dig/14-low (Kap. 3.1.14) und genomischer Büffelpocken Virus (OP1) DNA (100 ag bis 1 ng).

Der Nachweis von Orthopockenviren Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA ist jeweils mit einer Nachweisgrenze von ca. 10 fg bzw. 50 GÄ möglich. Der PCR-ELISA ist jedoch gegenüber einer klassischen PCR mit Nachweis der Amplikate im Gel spezifischer, da der ELISA einen zusätzlichen Spezifitätsnachweis darstellt.

3.2.4.3 Implementierung einer Amplifikationskontrolle

Zum Ausschluß falsch negativer PCR-Resultate sollten Amplifikationskontrollen durchgeführt werden. Der Einsatz von Kontroll-DNA als internen Standard wird von verschiedenen Arbeitsgruppen (vgl. Kap. 2.4.3) als zuverlässige Methode beschrieben.

A Konstruktion von Kontroll-DNA mittels PCR-Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit kommt ein interner Standard in Form einer von der Ziel-DNA abgeleiteten Sequenz (Kontroll-DNA) zum Einsatz. Die Kontroll-DNA wird dem

jeweiligen Reaktionsansatz in definierter Konzentration zugesetzt und stets parallel zu der möglicherweise in der Probe vorhandenen Wildtyp-DNA amplifiziert. Auf der Grundlage des wie in Kapitel 3.2.4.2A beschrieben erstellten Abgleichs der Amplifikatsequenzen wurde für das jeweilige Nachweissystem durch eine PCR *in vitro* Mutagenese eine interne Kontroll-DNA hergestellt (Kap. 3.1.17.1). Durch diese Substitutionsmutation wurde der zur Wildtyp-Fangsonde komplementäre Sequenzbereich gegen den zu der Standard-Sonde komplementären Sequenzabschnitt ausgetauscht. Die für das Orthopockenviren Nachweissystem verwendeten Primer sind in Kapitel 3.1.14 aufgelistet. Das entstandene Orthopockenviren ST-DNA Fragment hat eine Länge von 753 bp. Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten Kontroll-DNA erfolgte photometrisch nach Durchführung einer präparativen Gelelektrophorese und anschließender Elution der PCR-Produkte aus der Agarose mittels Extraktions-Kit (Kap. 3.1.16.1). Die Korrektheit der Sequenz jeder einzelnen Kontroll-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

B Nachweiseffizienz von Wildtyp- und Standardamplifikaten

Auf der Grundlage der für das Nachweissystem bestimmten ELISA-Parameter konnte die Nachweiseffizienz von Amplifikaten der Wildtyp-DNA mit der Wildtyp Fangsonde und Amplifikaten der Kontroll-DNA mit der Standard Fangsonde ermittelt werden (Kap. 3.1.16.2F). Der Nachweis der PCR-Produkte wurde als Doppelansatz durchgeführt. Es werden jeweils die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen angegeben. Die Extinktion aus den jeweiligen Kreuzhybridisierungen zwischen Wildtyp-DNA und Standard Fangsonde sowie Kontroll-DNA und Wildtyp Fangsonde lagen im Durchschnitt bei $\leq 0,05$ ($OD_{450\text{ nm}}$). Abb. 3-20 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung unter Verwendung der Sonde OP-1-bio als Wildtyp- und STp12/19-bio als Standard-Fangsonde in äquimolarem Verhältnis.

Die Detektion der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung in der Mikrotiterplatte zeigt für Orthopockenviren Wildtyp- und Kontroll-DNA unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen keine vergleichbare Effizienz (Abb. 3-20). Für eine Kopie Kontroll-DNA wird eine Extinktion von 0,767 ermittelt. Fünf Kopien Wildtyp-DNA können im ELISA nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich weisen die beiden dargestellten Kurven einen untypischen Kurvenverlauf auf. Im Bereich höherer DNA Konzentrationen sinken die ermittelten Extinktionswerte zum Teil erheblich ab. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die schnelle Renaturierung eines Anteils der Amplifikate sein, bevor die mit Digoxigenin markierten Einzelstränge mit der entsprechenden Fangsonde hybridisieren konnten. Zu erwarten wäre jedoch nach Anstieg der Werte ein etwa gleichbleibender Extinktionswert für hohe DNA Konzentrationen, da eine Überprüfung der Ergebnisse durch den Nachweis der

PCR-Produkte im Agarosegel (Kap. 3.1.11) zeigt, dass sowohl für die eingesetzte Wildtyp- als auch für die Kontroll-DNA das typische Bild einer Verdünnungsreihe mit steigender Bandenintensität bei steigender DNA-Konzentration beobachtet werden konnte (ohne Abb.).

Es wurden deshalb für das Orthopockenviren Detektionssystem modifizierte Sonden getestet, die zusätzlich zum Sondenbereich am 5'-Ende einen Spacer (5'-TTTTT-Sondensequenz) beinhalten (vgl. Tabelle 3-20). Abb. 3-21 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung von 0 bis 5×10^6 bzw. 1×10^7 Kopien Wildtyp- bzw. Kontroll-DNA unter Verwendung der Sonden OP-1-bio/spac als Wildtyp- und STp12/19-bio/spac als Standard-Fangsonde. Unter Verwendung dieser verlängerten Sonden zeigt die Detektion der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung in der Mikrotiterplatte für Orthopockenviren Wildtyp- und Kontroll-DNA eine vergleichbare Effizienz. Für den Wildtyp wurde nun ein „typischer“ Kurvenverlauf mit Plateau erhalten. Dies deutet auf sterische Probleme bei der Hybridisierung von WT-Sonde und Amplifikat hin. Für die Verringerung der gemessenen Extinktionswerte der Kontroll-DNA im Bereich von 10^2 bis 10^6 Kopien konnte keine weitere Erklärung gefunden werden, jedoch war der Effekt unter Verwendung der Sonde mit integriertem Spacer deutlich geringer als mit der vormals eingesetzten Sonde ohne Spacer (vgl. Abb. 3-20). Während ohne Spacer die Extinktionen für die Kontroll-DNA unter 1,0 absinken, sanken sie unter Verwendung der Sonde mit Spacer nicht unter 1,0. Ferner hat sich das Verhältnis zwischen erstem Maximum und Minimum im Detektionsbereich von 1:4 (ohne Spacer) auf 1:2 (mit Spacer) verringert.

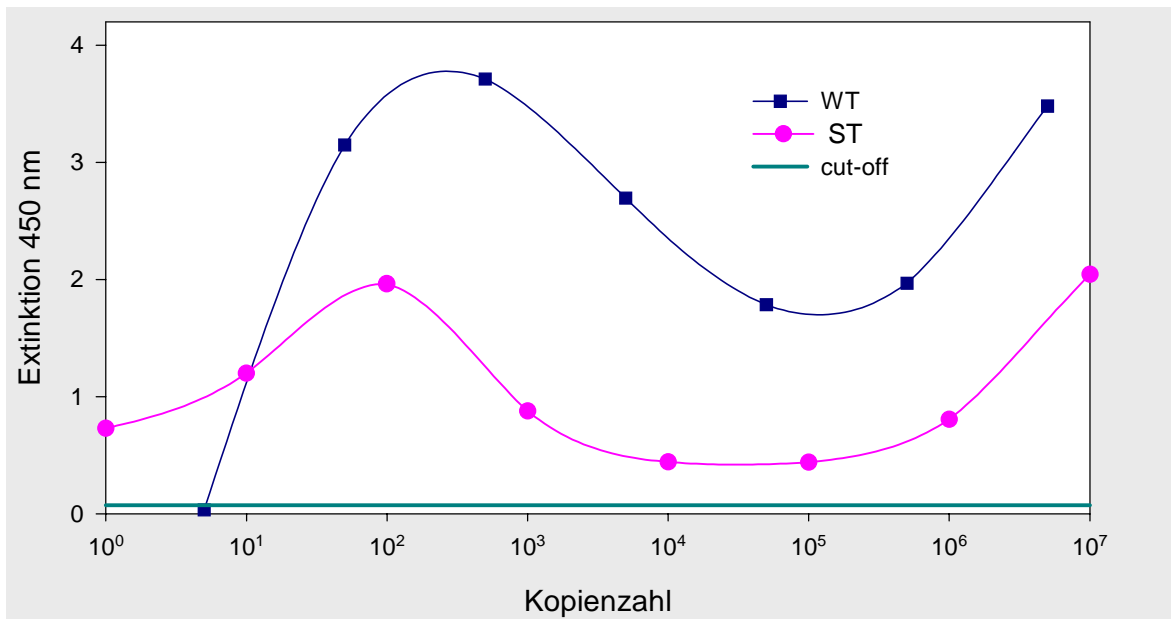


Abb. 3-20: Nachweiseffizienz von WT- und ST-Amplifikaten im PCR-ELISA

Die Amplifikation wurde mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low und genomischer Büffelpockenvirus-DNA (OP1) durchgeführt. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte erfolgte mit 1,5 pmol je Kavität biotinylierter WT- und ST-Fangsonde. Die 280 bp Amplifikate wurden nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) kolorimetrisch durch Messung der Extinktion bei 450 nm gegen 650 nm nachgewiesen.

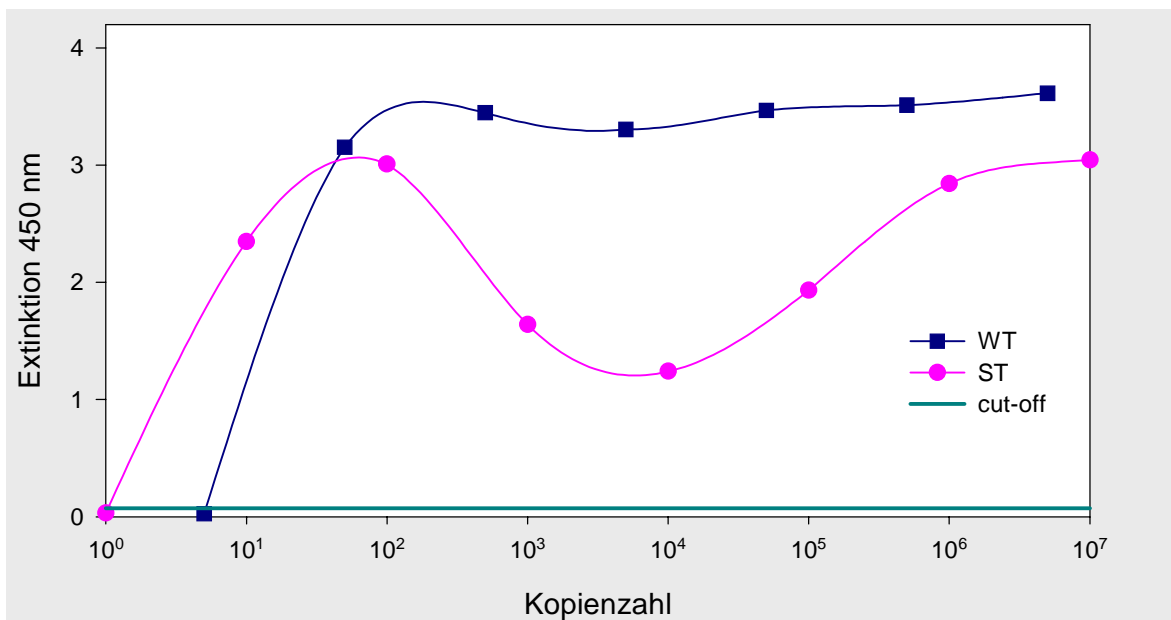


Abb. 3-21: Nachweiseffizienz von WT- und ST-Amplifikaten im ELISA unter Verwendung von modifizierten Fangsonden

Die Amplifikation wird mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low durchgeführt. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte erfolgt mit 1,5 pmol je Kavität biotinylierter WT-Fangsonde (Op-1-spac) bzw. ST-Fangsonde (Stp12/19-spac) mit integriertem Spacer. Die 280 bp Amplifikate werden nach dem Prinzip des ELISA kolorimetrisch nachgewiesen.

C Einstellung einer geeigneten Kontroll-DNA Konzentration

Der Zusatz einer Kontroll-DNA als internen Standard in die PCR dient der Überprüfung der Amplifizierbarkeit der potentiell in der Probe vorhandenen Ziel-DNA. Die Konzentration der in die PCR eingesetzten internen Kontroll-DNA ist so zu wählen, dass bei Abwesenheit von Ziel-DNA in einer Probe die zugesetzte Kontroll-DNA amplifiziert wird und eine eindeutige Extinktion im ELISA liefert. Bei Anwesenheit von Ziel-DNA soll die Amplifikation in der kompetitiv verlaufenden PCR zugunsten der nachzuweisenden Erreger-DNA erfolgen. Um dies zu gewährleisten, werden kompetitive Amplifikationsreaktionen mit verschiedenen Konzentrationen interner Kontroll-DNA und einer dekadischen Verdünnungsreihe Wildtyp-DNA durchgeführt. Der Einsatz von interner Kontroll-DNA erfolgt in Konzentrationen von 10 ag bis maximal 10 fg. Genomische Wildtyp-DNA wurde im Konzentrationsbereich von 100 ag bis 1 ng verwendet. Als Kontrollen dienen Reaktionen mit entweder Wildtyp- oder Kontroll-DNA allein. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für das Orthopockenviren Nachweissystem.

Für das Orthopockenviren Nachweissystem werden die Analysen zur Bestimmung einer optimalen Kontroll-DNA Konzentration als PCR-ELISA unter Verwendung der Fangsonden (WT und ST, vgl. Tabelle 3-20) ohne Spacer durchgeführt (Abb. 3-22).

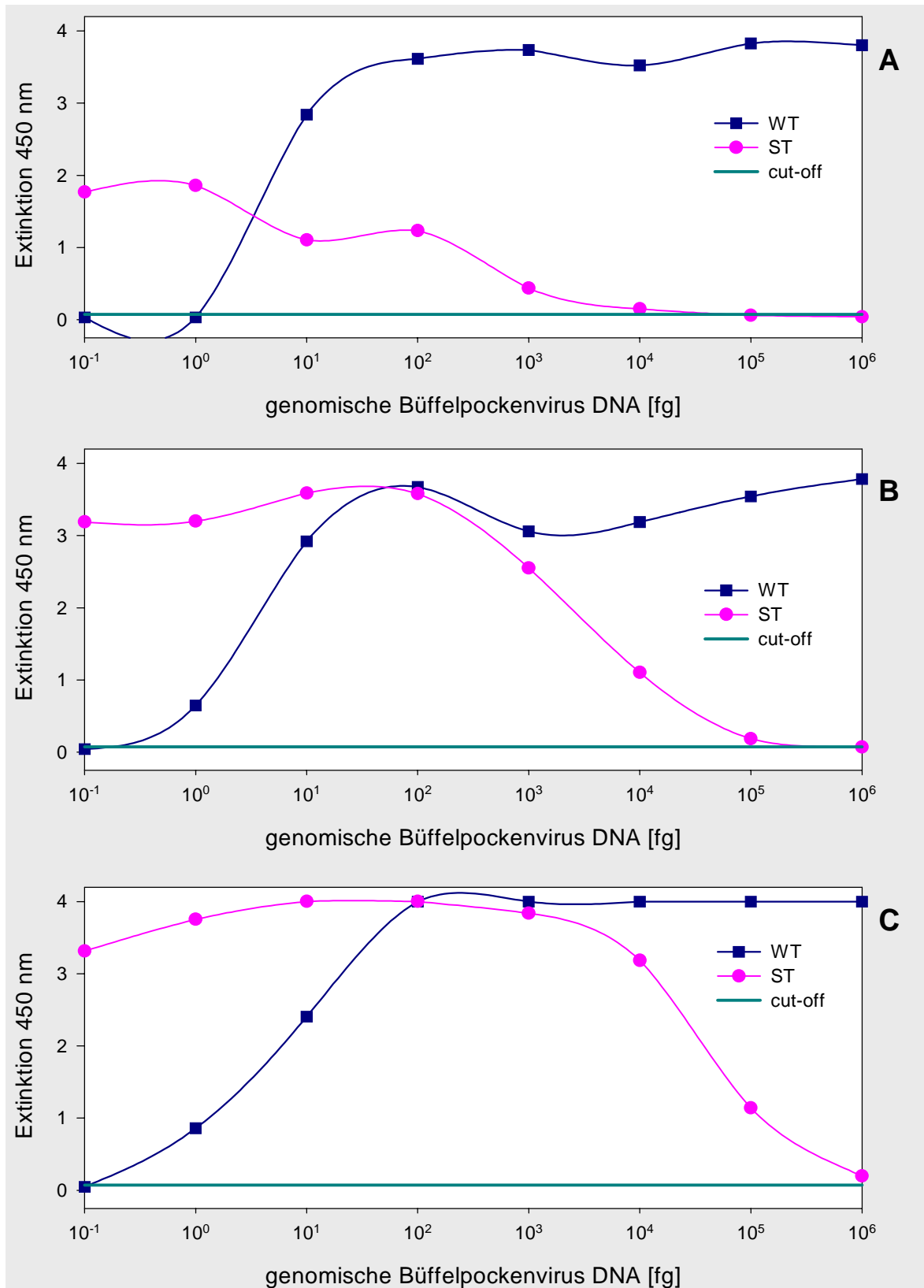


Abb. 3-22: Kompetitive PCR und Nachweis der Amplifikate mittels ELISA

Kolorimetrischer Nachweis von Amplifikaten einer kompetitiven PCR mit spezifischen biotinylierten Fangsonden ohne Spacer (WT bzw. ST). Die Amplifikation von jeweils 10 ag (Grafik A), 100 ag (Grafik B) bzw. 1 fg (Grafik C) Kontroll-DNA erfolgte mit 100 ag bis 1 ng genomischer Orthopockenviren DNA mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low.

Die Abb. 3-22 zeigt, dass der Nachweis von 100 fg bis 1 ng Orthopockenviren DNA durch den Zusatz von 0,01 fg bzw. 0,1 fg Kontroll-DNA nicht beeinträchtigt wird. In beiden Fällen kann auch bei Einsatz von 10 bis 100 fg in die PCR noch eine meßbare Extinktion ermittelt werden. Diese Werte sind vergleichbar mit der für das PCR-System ermittelten Sensitivität (Abb. 3-16). Erst durch den Zusatz von 1,0 fg Kontroll-DNA wird die Amplifikation von Orthopockenviren DNA beeinträchtigt. Infolge der Konkurrenz sind die gemessenen Extinktionswerte einer PCR mit < 1000 fg deutlich geringer.

Bei der Betrachtung der Extinktionswerte für die Kontroll-DNA waren die Werte bei Verwendung von 0,01 fg generell niedrig und für den Einsatz als Amplifikationskontrolle wenig geeignet (Abb. 3-22 A). Auch der Einsatz von 1,0 fg ist auf Grund der auftretenden Konkurrenz des Wildtyp-Signals nicht als Amplifikationskontrolle geeignet (Abb. 3-22 C). Die Amplifikationsreaktionen mit 0,1 fg Kontroll-DNA ergibt dagegen eindeutige Extinktionswerte, ohne eine Konkurrenz der Amplifikation von Wildtyp-DNA zu bewirken. Diese Menge an Kontroll-DNA ist somit als Amplifikationskontrolle geeignet. Sie gewährleistet maximale Sensitivität für den Nachweis von Orthopockenviren bei eindeutigen Extinktionswerten für die Kontroll-DNA. Der für den Nachweis der Kontroll-DNA in Kap. 3.2.4.3B (Abb. 3-20 bzw. Abb. 3-21) dargestellte Effekt einer Verringerung der Extinktionswerte wurde bei der kompetitiven PCR nicht mehr beobachtet. Zum Vergleich werden analoge Versuche unter Verwendung der durch einen Spacer verlängerten Fangsonden durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt die Abb. 3-23. Abb. 3-24 zeigt einen direkten Vergleich der erhaltenen Ergebnisse für die Detektion von Orthopockenviren unter Verwendung von Fangsonden mit und ohne Spacer. Ein Vergleich der gemessenen Extinktionswerte bei Verwendung von Fangsonden mit bzw. ohne Spacer zeigt unterschiedliche Tendenzen auf. Einerseits werden bei der Detektion von Wildtyp-DNA mit den verlängerten Sonden (OP-1/Spac bis OP-4/Spac) höhere Extinktionswerte gemessen. Andererseits werden unter Verwendung der verlängerten Standardsonde STp12/19/spac zur Detektion von Kontroll-DNA geringere Extinktionen erzielt. Für eine optimale Detektion ist also im ELISA die Kombination der Wildtyp-Sonden mit Spacer und der Standard-Sonde ohne Spacer zu verwenden.

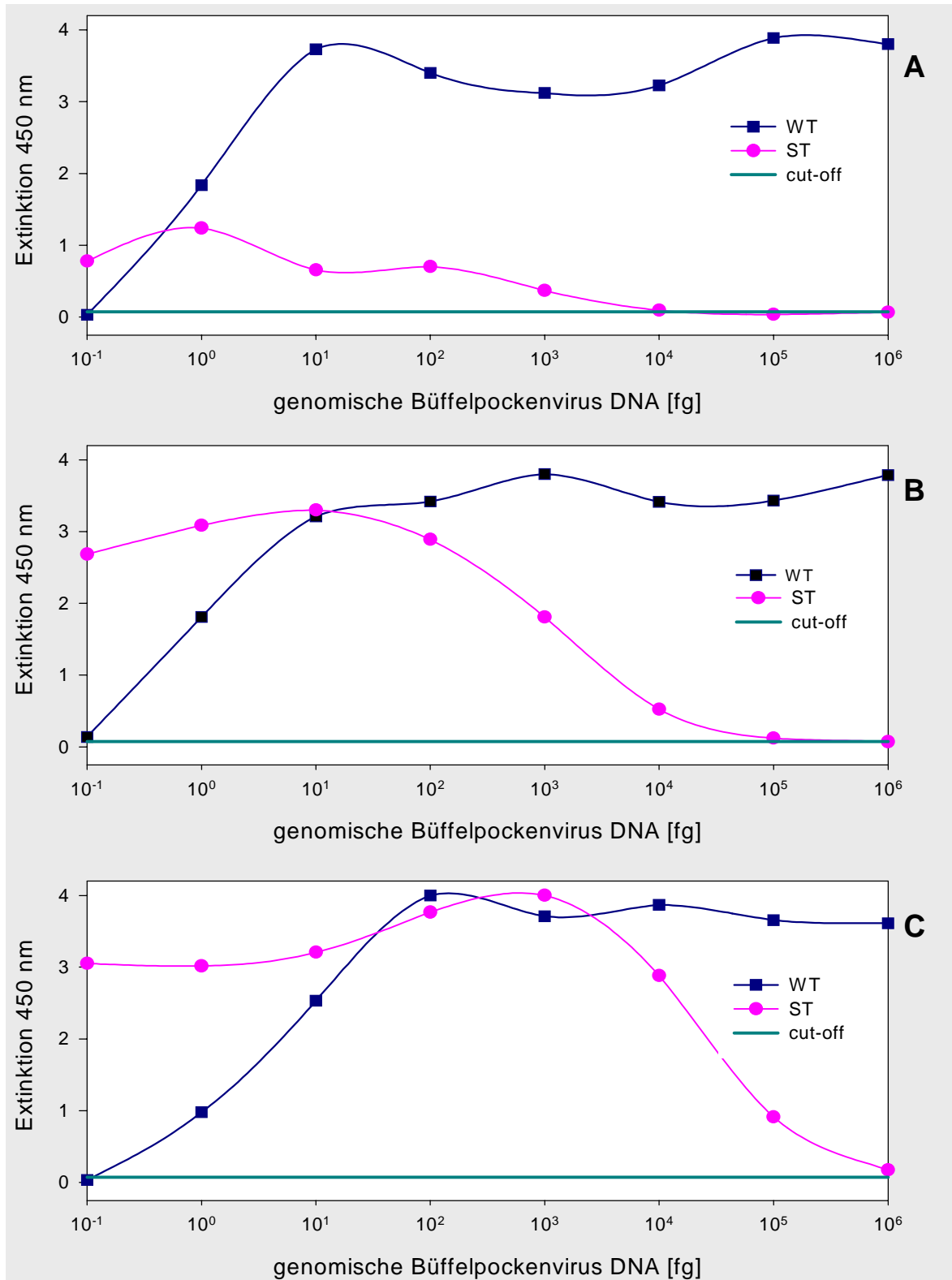


Abb. 3-23: Kompetitive PCR und Detektion im ELISA unter Verwendung von spezifischen Sonden mit integriertem Spacer

Kompetitive Amplifikation von jeweils 10 ag (Grafik A), 100 ag (Grafik B) bzw. 1 fg (Grafik C) Kontroll-DNA mit 100 ag bis 1 ng genomischer Orthopockenviren DNA mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low. Der Nachweis der Amplifikate erfolgt kolorimetrisch nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) nach Hybridisierung mit den spezifischen biotinylierten Fangsonden mit Spacer (WT bzw. ST).

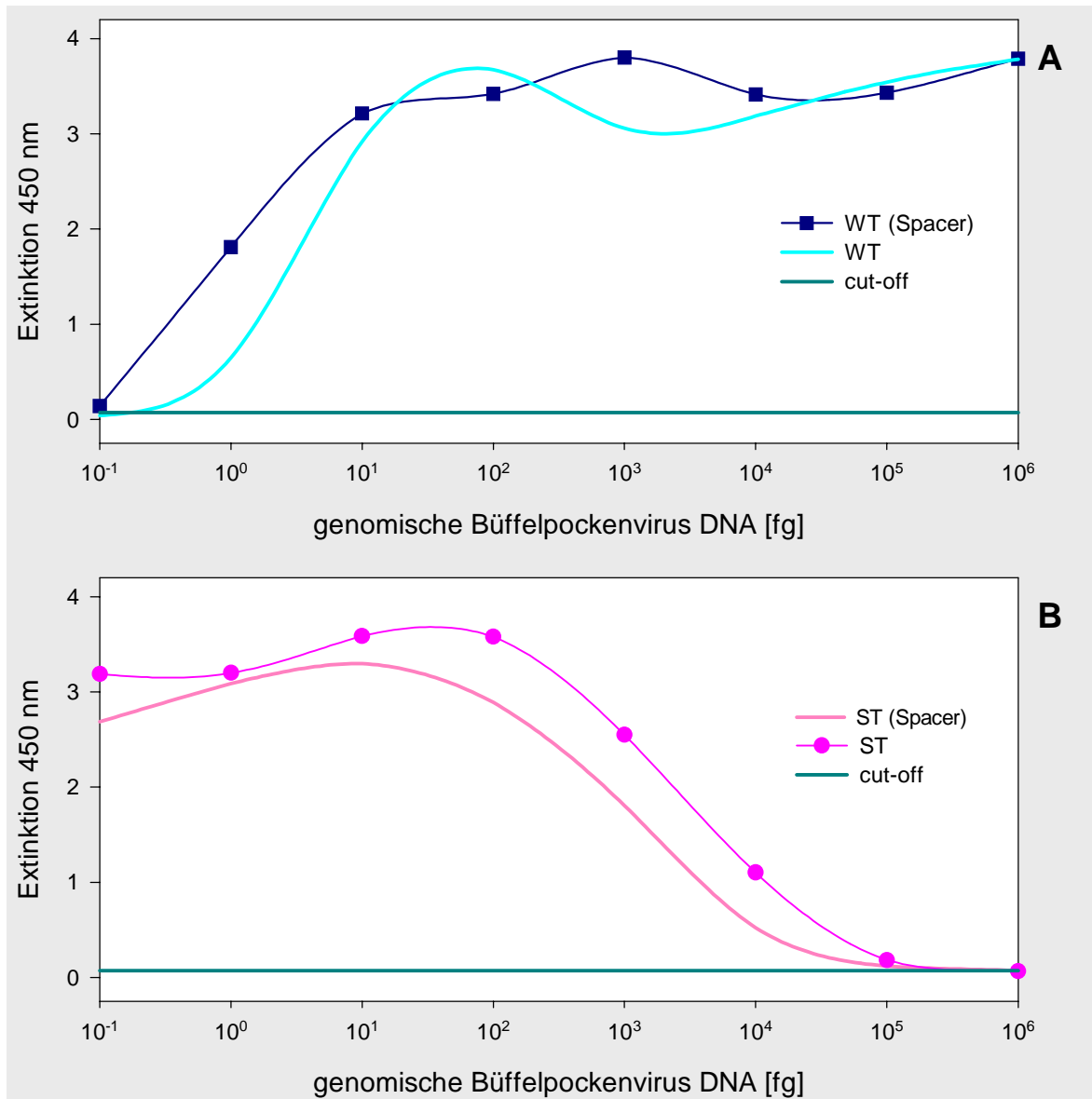


Abb. 3-24: Datenvergleich: Detektion von Orthopockenviren im ELISA unter Verwendung von spezifischen Sonden mit bzw. ohne integriertem Spacer

Kompetitive Amplifikation von jeweils 100 ag Kontroll-DNA mit 100 ag bis 1 ng genomischer Orthopockenviren DNA mit der Primerkombination 14-up-Dig/14-low. Der Nachweis der Amplifikate erfolgt kolorimetrisch nach dem Prinzip des ELISA (Kap. 3.1.16.2) nach Hybridisierung mit den spezifischen biotinylierten Fangsonden mit bzw. ohne integrierten Spacer

Abb. A: Detektion des Wildtyp-Signals; Abb. B: Detektion des Kontroll-DNA Signals (ST)

3.3 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische Nachweissysteme für *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* und Orthopockenviren auf der Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entwickelt. Diese Systeme ermöglichen einen Nachweis der hochpathogenen Erreger ohne zusätzliches kulturelles Anzuchtverfahren. Um falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können, wurde eine Amplifikationskontrolle implementiert. Es wurden die Bedingungen für eine kompetitive PCR mit einer internen Kontroll-DNA („interner Standard“) als Amplifikationskontrolle für das jeweilige Nachweissystem entwickelt. Um in der PCR die gleiche Amplifikationseffizienz zu erzielen, wurden die internen Kontroll-DNA's von der jeweiligen Erreger spezifischen Ziel-DNA abgeleitet. Letztlich unterscheiden sich Ziel- und Kontroll-DNA nur durch eine modifizierte Basenabfolge im Sondenbereich von 20-25 bp. In Hinblick auf eine Automatisierbarkeit der Nachweise wurde die kolorimetrische Detektion der Amplifikate in Form eines „PCR-ELISA“ in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten etabliert. Dazu wurden für die einzelnen Nachweissysteme 20-25 bp lange biotinylierte Fangsonden sowohl für die interne Kontroll-DNA (ST) als auch für die Erreger spezifische Wildtyp-DNA (WT) entwickelt. Zur Vermeidung von möglichen Kontaminationen wurde routinemäßig Uracil-N-Glycosylase im PCR-ELISA eingesetzt.

3.3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE IDENTIFIZIERUNG VON INFektionSERREGERN

In den letzten Jahren konnte in klinischen Laboren eine ständig steigende Akzeptanz und ein verstärkter Gebrauch eines breiten Spektrums von kommerziellen und nicht-kommerziellen PCR-basierten Tests sowie anderer Methoden der Nukleinsäure-amplifikation für die direkte Detektion von mikrobieller DNA in klinischen Proben beobachtet werden (Baumforth *et al.*, 1999; Vaneechoutte *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 1992). Die PCR hat erlaubt, die biologische Kultur auf künstlichen Medien gegen die enzymatische Amplifikation der Nukleinsäuren *in vitro* auszutauschen. Dies ist besonders wichtig für langsam wachsende Bakterien und wesentlich für schwierig zu kultivierende Organismen. Im Zusammenhang mit immungeschwächten Patienten kann dies lebensrettend sein, indem es die rechtzeitige Diagnose und nachfolgende adäquate Therapie der Infektion erlaubt. PCR-basierte Methoden bieten eine Steigerung der Sensitivität und der Spezifität sowie eine Vereinfachung der Detektionsformate (Sitchenko *et al.*, 1999).

Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Infektionserregern *C. burnetii*, *F. tularensis* und Orthopockenviren ist der Ersatz bzw. die Ergänzung der

konventionellen Nachweismethoden durch ein molekularbiologisches, PCR-basiertes Verfahren aus verschiedenen Gründen sinnvoll. Ziel dieser Arbeit war es, durch die Etablierung von Nachweissystemen (PCR-ELISA) für die genannten Erreger eine kultivierungsunabhängige Detektion dieser Krankheitskeime zu ermöglichen. Die Vermeidung der Kultivierung solcher hochpathogener Erreger vermindert das Infektionsrisiko für das bearbeitende Personal erheblich. Ferner ist ein verbreiteter Einsatz solcher Nachweisverfahren denkbar, wohingegen die Anzucht von Erregern der Risikoklasse 3 Speziallaboratorien vorbehalten sein sollte. Positiv zu bewerten ist ebenfalls die relativ kurze Dauer der Diagnosestellung innerhalb von einem Arbeitstag sowie die Möglichkeit, den Erreger direkt nach Krankheitseintritt zu identifizieren. Serologische Verfahren zum Nachweis von *C. burnetii* und *F. tularensis* hingegen können erst ab der zweiten Krankheitswoche eingesetzt werden (RKI, 1999).

3.3.2 DNA-PRÄPARATION

Wie schon einleitend in Kapitel 2.4 dargestellt, sind für eine erfolgreiche Detektion von mikrobiellen Krankheitserregern mit molekularbiologischen Methoden aus klinischen und anderen Materialien drei Schritte erforderlich. Der erste wichtige Schritt - die Probenaufarbeitung - beinhaltet hauptsächlich die Freisetzung und Konzentration der Nukleinsäuren und bezieht die Beseitigung von Amplifikationsinhibitoren mit ein (Ieven *et al.*, 1997). Die Probenaufarbeitung von Erreger haltigem Probenmaterial wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht schwerpunktmäßig untersucht. Auf Grund der hohen Relevanz für das Ergebnis eines molekularbiologischen Nachweises von Krankheitserregern soll im Folgenden jedoch eine kurze theoretische Betrachtung erfolgen.

Für die DNA-Präparation aus Reinkulturen und Probenmaterial sind verschiedene kommerziell erhältliche Präparationskits auf dem Markt, welche einfach und bequem in der Durchführung sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „High Pure PCR Template Prep. Kit“ der Fa. Roche eingesetzt, um genomische DNA aus Reinkulturen verschiedener Isolate der Erreger zu präparieren. Die kulturelle Anzucht der Erreger wurde in den Laboratorien der BioteCon bzw. BIOTECON Diagnostics GmbH nicht durchgeführt, da keine Zulassung für Arbeiten mit Mikroorganismen der Risikogruppe L3 vorliegt. Daher wurden Fragestellungen bezüglich der Extraktion von Erreger-DNA aus „Realproben“ im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Qualität der DNA-Extraktion beeinflusst jedoch maßgeblich das Ergebnis eines Nachweises von Infektionserregern auf genetischer Ebene (Mauel *et al.*, 1999). Für viele Erreger wurden bereits Standardprotokolle zur DNA-Extraktion aus diversem Probenmaterial etabliert. Edingloh *et al.* (1999) verwenden zur Präparation

von *Coxiella burnetii* aus Milch das QIAmp[®] Tissue Kit (Qiagen). Kato *et al.* (1998) wenden zur Detektion von *C. burnetii* in Blutproben ein DNA-Extraktionsprotokoll nach Furuya *et al.* (1991) an. Auch andere Arbeitsgruppen arbeiten nach ähnlichen Protokollen und verwenden SDS und Proteinase K zur Degradierung der Zellen und anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung der *Coxiellen*-DNA (Stein *et al.*, 1992). Für die DNA-Extraktion aus verschiedenen klinischen Proben zur anschließenden PCR-Detektion von *C. burnetii* wird von Lorenz *et al.* (1998) das Prep-A-Gene purification Kit (Bio-Rad) eingesetzt. Willems *et al.* (1994) verwenden ebenfalls ein kommerziell erhältliches Kit, um *C. burnetii* DNA aus Milch zu extrahieren.

Zur Detektion von *Francisella tularensis* in Blut mittels PCR wird die Probe mit Hilfe von Proteinase K und „digestion“-Puffer verdaut und die gesamten Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform extrahiert (Long *et al.*, 1993). Dolan *et al.* (1998) verwendet zur DNA-Extraktion (*F. tularensis*) Standardmethoden nach Strauss (1993). Auch Shaw *et al.* (1998) setzt ein Standardprotokoll (Ausubel *et al.*, 1991) zur Isolation genomischer DNA (*F. tularensis*) ein. Fulop *et al.* (1996) vergleicht zwei Methoden zur Präparation von *Francisella* DNA aus klinischen Proben. Dabei werden je nach verwendeter DNA-Extraktionsmethode unterschiedliche Sensitivitäten in der PCR erreicht. Im Rahmen von Untersuchungen zur Detektion von *F. tularensis* in klinischen Proben werden von Sjostedt *et al.* (1997) vier verschiedene DNA-Präparationsmethoden angewandt. Die Bandbreite der Methoden reicht von keiner Behandlung der Probe überhaupt (A) über die Anwendung eines kommerziellen Kits (B) bis zur Verwendung von zwei Standard-DNA-Extraktionsmethoden (C, D). Dabei wurde mit Methode A keine, B eine, C drei und D acht aus zehn Proben als PCR positiv detektiert. Dies zeigt deutlich, wie groß der Einfluß der gewählte DNA-Extraktionsmethode auf das Ergebnis des Nachweises sein kann.

Auch für die Extraktion von Viren-DNA sind einige Standardprotokolle verfügbar. Neubauer *et al.* (1998) verwendet zur Präparation der Virus-DNA eine Methode nach Meyer *et al.* (1994). Für die gesamt-DNA-Präparation aus mit Orthopockenviren infizierten Zellen wird von Ibrahim *et al.* (1997, 1998) ein kommerzielles Kit eingesetzt. Auch Sandvik *et al.* (1998) verwendet ein kommerzielles Kit.

Eine große Vielfalt von verschiedenartigen Probenaufbereitungsverfahren ist beschrieben worden, insbesondere für die PCR (Iven *et al.*, 1997). Insgesamt scheint eine beinahe unüberschaubare Zahl an DNA-Extraktionsprotokollen und kommerziellen DNA-Präparationskits verfügbar zu sein. Im Einzelfall sollten für den jeweiligen Anwendungsfall Untersuchungen durchgeführt werden, inwieweit die gewählte Probenvorbereitungsmethode in Zusammenhang mit dem nachfolgenden

molekular-biologischen Nachweisverfahren für die Detektion von Mikroorganismen geeignet ist. Phillips *et al.* (2000) empfiehlt, im Fall einer Quantifizierung von Bakterien über kompetitive PCR für jeden Probenotyp eine separate Standardkurve aufzunehmen, da Unterschiede in der DNA-Extraktion, die z.B. die Qualität der DNA oder ihre Reinheit betreffen, signifikante Auswirkungen auf die Amplifikation von Ziel- und Kontroll-DNA haben.

3.3.3 NACHWEISSYSTEM FÜR *COXIELLA BURNETII*

Für schwer kultivierbare Erreger, zu denen auch *C. burnetii* zählt, stellt die PCR die Nachweismethode der Wahl dar (Edingloh *et al.*, 1999). *Coxiella burnetii* spezifische PCR-Nachweissysteme basieren auf der Amplifikation unterschiedlicher Gene, wie z.B. *gyrA* (Spyridaki *et al.*, 2000), *com1* (Sekeyova *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998 bzw. 1997) oder *IS1111* (Courtney *et al.*, 1999; Edingloh *et al.*, 1999; Lorenz *et al.*, 1998; Willems *et al.*, 1994) (vgl. auch Tabelle 2-1). Die wesentlichen Unterschiede der PCR-Systeme liegen dabei in der Spezifität und Sensitivität.

3.3.3.1 Spezifität

Die Spezifität jedes PCR-Systems hängt davon ab, wie gut die Primer im Vergleich zu unspezifischen Abschnitten der Matrize an die Ziel-DNA hybridisieren.

Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierte Genregion liegt innerhalb der Transposon ähnlichen repetitiven Sequenz *IS1111*. Die verwendeten Primer (Willems *et al.*, 1994) sind spezifisch für Mikroorganismen der Spezies *C. burnetii*, wie durch Untersuchungen mit ca. 50 verschiedenen Mikroorganismen (nicht *Coxiella*) gezeigt werden konnte. Die Spezifität innerhalb der Spezies *C. burnetii*, die mit 19 verschiedenen Isolaten getestet wurde, lag mit den verwendeten Amplifikationsprimern bei 100 %. Willems *et al.* (1994) zeigt den spezifischen Nachweis von 42 verschiedenen *C. burnetii* Isolaten. Gleichzeitig wurde unter Verwendung von 44 weiteren Spezies (nicht *Coxiella*) keine Amplifikation beobachtet. Die Ergebnisse von Willems *et al.* (1994) für das verwendete Primerpaar Trans1/Trans2 konnten durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Ein hochspezifisches System zum Nachweis von *C. burnetii* beschreibt auch Edingloh *et al.* (1999). Bei insgesamt 891 durchgeführten PCR-Ansätzen kam es in keinem Fall zu einem nicht gesuchten PCR-Produkt. Ferner zeigen Stein *et al.* (1992) den spezifischen Nachweis von 8 verschiedenen *C. burnetii* Isolaten, parallel wurde unter Verwendung von 25 weiteren Spezies (nicht *Coxiella*) keine Amplifikation beobachtet. Im Praxistest zeigt das von Kato *et al.* (1998) etablierte nested PCR-System eine geringere Spezifität. Hier waren bei der Untersuchung von

Blutproben 9,6 % der Kontrollproben von gesunden Patienten PCR positiv. Es ist nicht auszuschließen, dass einige dieser falsch positiven Ergebnisse möglicherweise durch das erhöhte Kontaminationsrisiko bei einer nested PCR hervorgerufen wurden.

3.3.3.2 Sensitivität

Ein wichtiges Kriterium der auf Basis der PCR etablierten Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen ist die Sensitivität. Diese ist von einer Vielzahl von chemischen und technischen Faktoren abhängig. Wichtig ist z.B. die Auswahl der Genregion und die davon abgeleiteten, zur Amplifikation verwendeten Primer. Ferner beeinflusst das verwendete Detektionssystem die Sensitivität des Nachweises.

Bedauerlicherweise existieren in der Literatur keine standardisierten Angaben bezüglich der Sensitivität, was einen Vergleich erheblich erschwert. Einige Autoren beziehen sich auf die geringste Menge von DNA, die detektiert werden kann, andere hingegen auf die DNA-Menge, die für eine Amplifikation eingesetzt werden muß, oder auf die Zellzahl pro Milliliter oder pro Reaktion (Scheu, 1999). Dabei kann sich das verwendete Reaktionsvolumen ebenfalls unterscheiden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Nachweisgrenze der PCR für *C. burnetii* DNA mit einer Primerkombination in Abhängigkeit von zwei Nachweismethoden ermittelt. Der Nachweis von *C. burnetii* Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA war jeweils mit einer Nachweisgrenze von 100 ag an initial in die PCR eingesetzter DNA möglich. Bei einer angenommenen Genomgröße von 2100 kbp entspricht diese DNA Menge zwischen null und einem Genomäquivalent von *Coxiella burnetii*. Diese Anzahl zwischen null und einem Partikel ist durch die Tatsache erklärbar, dass die *IS1111* Sequenz repetitiv vorliegt (Edingloh *et al.*, 1999). Im Genom vom Erregerstamm „Nine mile“ liegt diese Sequenz 19-fach vor (Hoover *et al.*, 1992). Willems *et al.* (1994) erreicht eine Nachweisgrenze von 1 Partikel in einem Milliliter Milch. Vergleichbare Ergebnisse erzielt Lorenz *et al.* (1998). Auch Berri *et al.* (2000) verwendet die „Trans-PCR“ nach Willems *et al.* (1994) in modifizierter Form und erreicht eine Nachweisgrenze von 1 Mikroorganismus pro ml Milch. Um die Sensitivität der Methode zu maximieren, ist es nach Berri *et al.* (2000) wichtig, die DNA-Extraktions- und Reinigungsmethoden zu optimieren. Insgesamt sind die mit der in dieser Arbeit verwendeten „Trans-PCR“ erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Sensitivität vergleichbar mit den in der Literatur verfügbaren Daten zu diesem PCR-System.

Eine vergleichbare Nachweisgrenze ermittelt Willems *et al.* (1993) mit der Amplifikation eines Abschnittes der 16S rRNA sowie der Plasmide QpH1, QpRS und QpDG. Allerdings verwendet Willems *et al.* (1993) ein nested PCR-System und

erreicht damit eine Nachweisgrenze von 1 Partikel pro Reaktion. Edingloh *et al.* (1999) erreicht durch die Amplifikation eines 219 bp Abschnittes der *IS1111* Sequenz eine Nachweisgrenze von 4 Partikeln pro ml, diese liegt um Faktor 4 höher als die mit 1 Partikel pro ml von Willems *et al.* (1994) angegebene Grenze. Das PCR-System zum Nachweis von *C. burnetii* von Stein *et al.* (1992) mit einer Sensitivität von 10 Partikeln pro Milliliter basiert auf der Amplifikation des Superoxid Dismutase Gens und ist um Faktor 10 weniger sensitiv. Da diese Nachweisgrenze auf einer Amplifikation mit nur 30 Zyklen beruht, ist der Unterschied möglicherweise dadurch bedingt. Ibrahim *et al.* (1997) beschreibt eine Nachweisgrenze von 10^2 bis 10^3 Bakterien bei der Amplifikation der 23S rDNA. Damit hat dieses PCR-System, obwohl es auf einer ribosomalen Genregion mit mehreren Kopien pro Genom basiert, eine um Faktor 100 bis 1000 geringere Sensitivität als das in dieser Arbeit beschriebene System. Im Vergleich zu einem einfach vorliegenden Target ist nach Woods *et al.* (1989) eine um den entsprechenden Faktor höhere Sensitivität zu erwarten. Insgesamt wird deutlich, dass die Sensitivität eines PCR-Systems maßgeblich durch die Genregion und die zur Amplifikation verwendeten Primer beeinflusst wird.

Neben den bereits erwähnten Faktoren hat das verwendete System zur Detektion der PCR-Produkte erheblichen Einfluß auf die Sensitivität des Nachweises. Bei der kolorimetrischen Detektion von *C. burnetii* spezifischen Amplifikaten in der Mikrotiterplatte lag die Nachweisgrenze bei 0,1 fg DNA bzw. 0 bis 1 Genomäquivalent (Abb. 3-5). Obwohl der Nachweis von Mikroorganismen im Mikrotiterplattenformat einerseits die Möglichkeit zur Automation und andererseits zur Quantifizierung bietet, gibt es bisher nur vereinzelt derartige Entwicklungen. So etablierte beispielsweise Courtney *et al.* (1999) einen PCR-ELISA mit einer Nachweisgrenze von 4 bis 40 Kopien der Ziel-DNA in einer PCR mit 30 Zyklen. Der Einfluß des Detektionssystems auf die Sensitivität wird noch unterstrichen durch die Arbeiten von Fritz *et al.* (1995). Bei einer Detektion im Agarosegel war die Nachweisgrenze der PCR um 5 bis 10 fach geringer im Vergleich zur Detektion über die Hybridisierung der Amplifikate in der Mikrotiterplatte und anschließender kolorimetrischer Detektion. Auch Muramatsu *et al.* (1997) haben gezeigt, dass *C. burnetii* über PCR-ELISA sensitiver nachgewiesen werden kann als über eine konventionelle PCR. Eine weitere Steigerung der Sensitivität ist nach Niemeyer *et al.* (1997) durch den Einsatz von Chemolumineszenz oder Fluoreszenz anstatt der Kolorimetrie möglich. Um die maximale Sensitivität zu gewährleisten, sollte deshalb der Nachweis mittels Chemolumineszenz oder Fluoreszenz angestrebt werden. Möglicherweise wäre dadurch eine ggf. auch nur limitierte Verbesserung der Nachweisgrenze des hier beschriebenen PCR-Systems zu erreichen.

3.3.3.3 Amplifikationskontrolle

Ein weiterer Faktor, der die Ergebnisse eines PCR-basierten Nachweises maßgeblich beeinflusst, ist die mögliche inhibierende Wirkung der untersuchten Probenmatrix sowie die zur Probenvorbereitung eingesetzten Substanzen. Inhibitoren treten häufig auf und sind schwierig zu beseitigen (Ieven *et al.*, 1997). Die Methode der Wahl zum Ausschluß von PCR-Inhibitionen ist der Zusatz eines sog. „internen Standards“ (Kontroll-DNA) als Amplifikationskontrolle (Abravaya *et al.*, 2000, Courtney *et al.*, 1999, Rosenstraus *et al.*, 1998, Denis *et al.*, 1997, Jin *et al.*, 1994, Kolk *et al.*, 1994, Ulrich *et al.*, 1993; vgl. Kap. 2.4.3). Ieven *et al.* (1997) bezeichnet die Integration einer inneren Funktionskontrolle zur direkten Überprüfung der PCR als wichtige Voraussetzung für den routinemäßigen Einsatz von PCR-basierten Nachweissystemen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine von der Ziel-DNA-Sequenz abgeleitete Sequenz als Amplifikationskontrolle eingesetzt. Um für den PCR-Nachweis möglichst gleiche biophysikalische Bedingungen von Wildtyp- und Kontroll-DNA zu gewährleisten, wurde in das 678 bp lange spezifische Amplifikat, das mit der Primerkombination Trans1/Trans2 (Kap. 3.1.12) erhalten wurde, mittels PCR-Mutagenese eine Substitution eingefügt (vgl. Abb. 2-2). Durch diesen geringen Unterschied in der Basenabfolge sollte eine vergleichbare Amplifikationseffizienz beider Nukleinsäuren erzielt werden. Dass diese Voraussetzung gewährleistet ist, wurde in Kap. 3.2.2.3B gezeigt.

Im Gegensatz dazu verwenden andere Arbeitsgruppen veränderte Amplicons, die kürzer oder länger als die Wildtyp-Amplifikate sind, aber auch über die Primer-spezifischen Bindungsstellen verfügen. Folglich werden sie durch die gleichen Reagenzien wie die Wildtyp-Matrix amplifiziert und können leicht im Agarosegel differenziert werden (Ieven *et al.*, 1997). Edingloh *et al.* (1999) beschreibt ein Multiplex-PCR-System, bei dem Wildtyp- und Standard-DNA mit unterschiedlichen Primern amplifiziert werden. Inwieweit bei diesem und den vorgenannten Systemen die Amplifikationseffizienz beider Nukleinsäuren vergleichbar ist, wurde nicht dargestellt. Scheu (1999) äußert die Vermutung, dass es bezüglich der Amplifikationseffizienz weniger auf die absolute Länge und die Basenzusammensetzung der Amplifikate, sondern vielmehr auf die zur Amplifikation verwendeten Primer ankommt.

Courtney *et al.* (1999) verwendet entsprechend dem in dieser Arbeit eingesetzten System eine interne Kontrolle, die sich durch PCR-Mutagenese von der Wildtyp-DNA ableitet. Hier wurde ein 25 bp langer Abschnitt substituiert. Die Detektion der Amplifikate erfolgt ebenfalls über ELISA. Die dargestellten Ergebnisse zeigen eine geringe Sensitivität insbesondere für den kolorimetrischen Nachweis der Kontroll-

DNA. Hier werden maximal OD-Werte ($\lambda = 405 \text{ nm}$) von 0,5 für die Kontroll-DNA sowie 2,25 für die Wildtyp-DNA erreicht. Im Vergleich zu den eigenen Daten (Abb. 3-6) ist mit dem von Courtney *et al.* (1999) etablierten System insbesondere bei Verwendung von 4 Kopien der internen Kontrolle die verlässliche Detektion der Kontrolle nicht sichergestellt, und somit die beabsichtigte Funktionalität nur bedingt erreicht.

Als Alternative zu dem hier etablierten Prinzip des Zusatzes einer exogenen DNA kann eine endogene Sequenz als Amplifikationskontrolle verwendet werden (Edingloh *et al.*, 1999)

Interne Kontrollen erlauben auch die quantitative Bestimmung der Reaktion (Kolk *et al.*, 1994). Ziel einer quantitativen PCR ist es, von der in der PCR gebildeten Amplifikatmenge auf die eingesetzte Ausgangsmenge der DNA zu schließen. Daraus kann ggf. die Anzahl der Mikroorganismen in der untersuchten Probe berechnet werden. Dazu ist es notwendig, die Menge an Amplifikat in einer PCR zu bestimmen. Hier sind verschiedene Alternativen denkbar.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, kann dies mit einem exogenen DNA-Fragment, das dem PCR-Ansatz vor der Amplifikation zugefügt wird, gewährleistet werden. Durch den Vergleich der Amplifikate von Standard- und Wildtyp-DNA einer kompetitiven PCR läßt sich die ursprünglich vorhandene Menge von Wildtyp-DNA ermitteln. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die Amplifikationseffizienz beider Nukleinsäuren vergleichbar ist (Lisby, 1999). Das hier etablierte kompetitive PCR-System erfüllt damit die Voraussetzungen zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Bisher wurde die Amplifikationseffizienz des für den Nachweis von *C. burnetii* etablierten Systems nur grob verglichen (vgl. 3.2.2.3B). Vor einer Verwendung zur Quantifizierung sollten deshalb weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden. Sobald die Amplifikationseffizienz von Wildtyp- und Kontroll-DNA voneinander abweicht, ist nur noch eine semiquantitative Bestimmung der DNA-Menge möglich (Lisby, 1999; Ferre, 1992). Einschränkungen sind ferner dadurch bedingt, dass weder zuverlässige Angaben zum Zellaufschluß noch zur Effizienz der Probenaufarbeitung insbesondere bei verschiedenen Probenmatrices gemacht werden können. Deshalb ist es nicht möglich, von den bestimmten absoluten DNA-Mengen auf die Zellzahl in der untersuchten Probe zu schließen.

Eine Möglichkeit um Variationen in der Probenaufarbeitung anzuzeigen, ist die Koextraktion beider Nukleinsäuren. Dazu müßte die Kontroll-DNA der zu analysierenden Probe im Anschluß an den Zellaufschluß zugesetzt werden, um anschließend zusammen mit der Proben-DNA extrahiert und gereinigt zu werden.

Eine solche Strategie wird von Ieven *et al.* (1997) und Möller *et al.* (1997) beschrieben. Sie simuliert jedoch nur annähernd die Probenaufarbeitungsschritte nach der Zell-Lyse.

Die derzeit mögliche genaueste quantitative Bestimmung scheint erreicht zu werden, wenn die 5'-3' Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Freisetzung eines Fluoreszenzsignals während der Amplifikation angewendet wird (Lisby, 1999; Lie *et al.* 1998). Dabei ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes. Ursprünglich wurde bei dieser Methode lediglich eine Endpunktbestimmung durchgeführt. Die von Holland *et al.* (1991) eingeführte Methode wurde in den vergangenen Jahren technisch weiterentwickelt zu der heute bekannten TaqMan™ Technologie. Damit ist eine „online“ Detektion der Zunahme an Amplifikaten von Zyklus zu Zyklus möglich. Für eine exakte Quantifizierung ist jedoch auch in diesem Fall die Zugabe einer internen Standard-DNA notwendig. Um die Variation innerhalb einer PCR von einem Reaktionsgefäß zum nächsten zu beurteilen, hat sich die Nutzung eines internen Standards in der Amplifikationsreaktion bewährt.

3.3.4 NACHWEISSYSTEM FÜR *FRANCISELLA TULARENSIS*

Da *Francisella tularensis* die dritt-häufigste Labor-erworbene bakterielle Infektion ist, muß extreme Vorsicht im Umgang mit diesem Organismus ausgeübt werden (Shaw *et al.*, 1998). Auf Grund der Gefahr beim Arbeiten mit diesem hochpathogenen Bakterium - insbesondere bei der Kultivierung - ist die Etablierung alternativer kultivierungsunabhängiger Nachweisverfahren erforderlich. PCR-basierte Verfahren zum Nachweis von *Francisella tularensis* beruhen auf der Amplifikation unterschiedlicher Gene, wie z.B. 16S rDNA (Forsman, *et al.*, 1994; Sjostedt *et al.*, 1997; Dolan *et al.*, 1998), *FopA* (Fulop *et al.*, 1996) oder *TUL4* (Long *et al.*, 1993; Junhui *et al.*, 1996; Sjostedt *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1998; Grunow *et al.*, 2000) (vgl. auch Tabelle 2-2). Die wesentlichen Unterschiede liegen dabei in Spezifität und Sensitivität der PCR-Systeme.

3.3.4.1 Spezifität

In der vorliegenden Arbeit wird ein Abschnitt des *TUL4* Gens zum Nachweis von *Francisella tularensis* amplifiziert. Die verwendeten Primer (Long *et al.*, 1993) sind nach den gezeigten Ergebnissen nicht ausreichend spezifisch für den Nachweis von *F. tularensis*. In der PCR wurden nach Optimierung des Protokolls neben *F. tularensis* die Spezies *F. novicida*, *Wolbachia persica*, *Acinetobacter spp.*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* und sporadisch HSV2 im Agarosegel

nachgewiesen (vgl. Abb. 3-9). Dabei war insbesondere der Nachweis von *F. novicida* problematisch. Die getesteten spezifischen *F. tularensis* Isolate konnten alle unter Verwendung des Primerpaars Ft393/Ft642 nachgewiesen werden. Auch die darüber hinaus in die Untersuchungen mit einbezogenen Primer nach Junhui *et al.* (1996) bzw. Fulop *et al.* (1996) erschienen auf Grund mangelnder Spezifität sowie gesteigertem Arbeitsaufwand und Kontaminationsrisiko im Fall der nested PCR nach Fulop *et al.* (1996) nicht geeignet, um das PCR-System nach Long *et al.* (1993) bei der Etablierung des PCR-ELISA Nachweissystems für *F. tularensis* sinnvoll ersetzen zu können. Die erforderliche höhere Spezifität des Nachweissystems konnte über den ELISA implementiert werden. Trotz der hohen Sequenzhomologie von ca. 99 % im Amplifikatbereich zwischen *F. tularensis* und *F. novicida* konnte unter Verwendung der ausgewählten Wildtyp-Sonde der Nachweis von *F. novicida* im ELISA ausgeschlossen werden (vgl. Tabelle 3-27). Damit weist der etablierte PCR-ELISA für *F. tularensis* gegenüber den getesteten konventionellen PCR-Systemen eine deutlich höhere Spezifität auf.

Long *et al.* (1993) zeigt den spezifischen Nachweis von einem *F. tularensis* Isolat. Gleichzeitig wurde unter Verwendung von 15 weiteren Spezies (nicht *Francisella*) keine Amplifikation beobachtet. Diese Ergebnisse für das verwendete Primerpaar Ft393/Ft642 konnten durch die eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Im Rahmen der von Long *et al.* (1993) dargestellten Untersuchungen wurde *F. novicida* nicht getestet. Ferner wurden bei den Untersuchungen zur Kreuzreaktivität lediglich in PBS suspendierte Mikroorganismen wie z.B. *Staphylococcus aureus* eingesetzt, nicht aber wie im Rahmen der eigenen Untersuchungen DNA-Präparationen. Dies könnte eine Erklärung für die abweichenden Daten sein.

Fulop *et al.* (1996) weist die Spezifität der verwendeten Primer anhand von Untersuchungen mit einer Reihe von verschiedenen bakteriellen DNA-Proben nach. Hier wurde auch *F. novicida* in die Untersuchungen mit einbezogen. Jedoch ist die Aussage von Fulop *et al.* (1996), das PCR-Produkte der entsprechenden Größe nur von *Francisella*-DNA erhalten wurde, nicht eindeutig bezüglich einer Differenzierung zwischen *F. tularensis* und *F. novicida*. Demnach ist nicht klar, ob die von Fulop *et al.* (1996) gezeigten Ergebnisse vergleichbar mit den eigenen Daten sind.

Ferner zeigen Junhui *et al.* (1996) den spezifischen Nachweis von 2 *F. tularensis* Isolaten. Parallel wurde unter Verwendung von 18 weiteren Spezies (nicht *Francisella*) keine Amplifikation beobachtet. Diese Ergebnisse konnten mit den eigenen Untersuchungen nicht vollständig bestätigt werden. *Acinetobacter spp.* und *Legionella pneumophila* wurden hier nach gelelektrophoretischer Analyse als unspezifisches PCR-Produkte nachgewiesen (vgl. Abb. 3-10).

Ein System zum Nachweis von *F. tularensis* beschreibt auch Forsman *et al.* (1994). Bei insgesamt 33 verschiedenen Isolaten der Gattung *Francisella* sowie 9 anderer Spezies kam es in einem Fall zu einem nicht gesuchten PCR-Produkt. *Wolbachia persica* wurde ebenfalls mit den verwendeten 16S rDNA spezifischen Primern nachgewiesen. Forsman *et al.* (1994) bezeichnet *F. novicida* auf Grund der gefundenen hohen Sequenzhomologie auf 16S rDNA Ebene als Subspezies von *F. tularensis*. Eine Differenzierung der beiden Spezies war mit den von Forsman *et al.* (1994) verwendeten Primern nicht möglich.

Shaw *et al.* (1998) verwenden zur schnellen Detektion von Tularämie eine sog. „real-time“ PCR. Das System basiert auf der Amplifikation eines 301 bp Abschnittes des *TUL4* Gens. Die online Detektion erfolgt über die Messung des Fluoreszenzsignals im Verlauf der PCR. Im Anschluß wurde die Größe des Amplifikates mittels Agarosegel-elektrophorese bestimmt. Die Adaptation dieses Assays auf das LightCycler™ Format erlaubt die Identifikation von *Francisella tularensis* ausgehend von DNA-Extrakten innerhalb von weniger als 15 Minuten (Shaw *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde *F. novicida* nicht getestet. Auf der Basis eigener Sequenzdaten wird bezweifelt, dass eine Differenzierung von *F. tularensis* und *F. novicida* unter Verwendung des PCR-Systems nach Shaw *et al.* (1998) möglich ist. Im Bereich der verwendeten Primer ist die Sequenz von *F. novicida* homolog zu der von *F. tularensis*, weshalb vermutlich DNA beider Spezies amplifiziert würde. Möglicherweise könnte jedoch eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse die Differenzierung beider Spezies ermöglichen. Eigene Untersuchungen mit dem LightCycler™ System zur Bestätigung dieser Vermutungen waren nicht möglich.

3.3.4.2 Sensitivität

Die Nachweisgrenze der PCR für *F. tularensis* DNA wurde mit der ausgewählten Primerkombination in Abhängigkeit von zwei Nachweismethoden ermittelt. Der Nachweis von Amplifikaten im Agarosegel sowie nach dem Prinzip des ELISA war jeweils mit einer Nachweisgrenze von 100 fg an initial in die PCR eingesetzter genomischer DNA möglich. Bei einer angenommenen Genomgröße von 1,8 bis 2,0 mbp (Sjostedt, pers. commun.) entspricht diese DNA Menge ca. 50 Genomäquivalenten von *Francisella tularensis*.

Long *et al.* (1993) erreicht eine Nachweisgrenze von 1 KBE pro µl dotiertem Blut. Auch Junhui *et al.* (1996) gibt als Nachweisgrenze des verwendeten PCR-Systems 1 KBE pro µl verdünnter Reinkultur an. Fulop *et al.* (1996) gibt mehrere Nachweisgrenzen an. Mit einer „Standard-PCR“ unter Verwendung von verdünnten

Reinkulturen werden 5×10^4 KBE/ml nachgewiesen, mit einer nested PCR 100 KBE/ml bzw. 1 KBE pro Reaktion. In klinischen Proben werden je nach verwendeter Probenaufarbeitungsmethode 3×10^3 bzw. 5×10^2 KBE pro Reaktion nachgewiesen.

Grunow *et al.* (2000) erreicht eine Nachweisgrenze von 10^2 Bakterien/ml PBS unter Verwendung der Primer nach Long *et al.* (1993) und Durchführung der PCR in Anlehnung an das Protokoll nach Sjostedt *et al.* (1997). Im Vergleich zu den im Rahmen der Untersuchungen ebenfalls getesteten Nachweissystemen cELISA und hand held assay (HHA) war die PCR die sensitivste Nachweismethode. Möglicherweise auf Grund von Inhibition konnten bei Untersuchungen mit infizierten Gewebeproben mittels PCR nur ca. 87 % korrekt detektiert werden während mittels cELISA 100 % erreicht wurden. Im Vergleich zu den beiden vorgenannten Methoden ist der HHA nach Grunow *et al.* (2000) auf Grund der einfachen Handhabung und der Schnelligkeit der Diagnose geeignet für den Feldeinsatz. Verdächtige Proben sollten nachfolgend mittels der sensitiveren Labormethoden PCR bzw. cELISA untersucht werden. Ähnliche Ergebnisse erzielt auch Berdal *et al.* (2000) bei dem Vergleich von drei Nachweissystemen. Ein Einsatz der PCR nach Long *et al.* (1993) scheint jedoch im Zusammenhang mit Gewebeproben problematisch zu sein. Deshalb wird von Berdal *et al.* (2000) der gegenüber der PCR weniger sensitive Schnellnachweis „rapid immunochromatographic-test“ (RI-test) präferiert. Möglicherweise liegen die aufgezeigten Probleme beim Nachweis von *F. tularensis* mittels PCR nicht in der PCR als solche sondern in der Probenaufarbeitung oder dem Probentransport.

Sjostedt *et al.* (1997) vergleicht zwei PCR-Systeme zum Nachweis von *F. tularensis* bei Patienten mit serologisch bestätigter Diagnose Tularämie. Die Systeme beruhen auf der Amplifikation unterschiedlicher Gene, dem 16S rDNA bzw. TUL4 Gen. Mit dem TUL4 PCR-System wurden 73 % der serologisch bestätigten Krankheitsfälle richtig detektiert, während dies mit dem 16S System nur in 50 % der Fälle gelang. Möglicherweise kann die Sensitivität des Nachweises von Tularämie in der Praxis noch verbessert werden, indem versucht wird, den DNA-Abbau während des Probentransportes zu reduzieren (Sjostedt *et al.* 1997).

In einer vergleichenden Analyse der Diagnose von Tularämie mittels PCR gegenüber dem kulturellen Nachweis zeigt Johansson *et al.* (2000) deutlich die Überlegenheit der molekularbiologischen Diagnoseverfahren im Vergleich zur klassischen Diagnostik. Mittels PCR konnte *F. tularensis* in 75 % der Krankheitsfälle korrekt detektiert werden, während über Kultur lediglich 62 % gefunden wurden. Ferner konnte gezeigt werden, dass in Krankheitsfällen ohne Entwicklung von Serum-Antikörpern die PCR wichtig ist zur Verifizierung eines Verdachts auf Tularämie.

Neben den bereits erwähnten Faktoren hat das verwendete System zur Detektion der PCR-Produkte erheblichen Einfluß auf die Sensitivität des Nachweises. Dies wurde bereits in Abschnitt 3.3.3.2 im Zusammenhang mit der Sensitivität des Nachweissystems für *C. burnetii* diskutiert. Obwohl der Nachweis von Mikroorganismen im Mikrotiterplattenformat einerseits die Möglichkeit zur Automation und andererseits zur Quantifizierung bietet, gibt es bisher nur vereinzelt derartige Entwicklungen. Für den spezifischen Nachweis von *F. tularensis* stellt das hier etablierte PCR-ELISA System die erste Entwicklung dieser Art dar. Möglichkeiten zur weiteren Optimierung der Sensitivität gelten entsprechend 3.3.3.2. Higgins *et al.* (2000) berichtete kürzlich über ein Genus spezifisches PCR-EIA System zum Nachweis von *Francisella spp.* Die Nachweisgrenze lag hier bei der Verwendung eines optimalen DNA-Materials bei ca. 22 Bakterien. Dieser PCR-EIA ist offensichtlich sensitiver als das ebenfalls von Higgins *et al.* (2000) entwickelte Taqman™ PCR-System. Allerdings wird zur Durchführung des PCR-EIA mehr Zeit benötigt. Diese Sonden-basierten Methoden haben das Potential, in Feldsituationen eine molekulare „real-time“ bzw. „Hochdurchsatz“ Diagnostik zu ermöglichen (Higgins *et al.*, 2000).

3.3.4.3 Amplifikationskontrolle

Da Inhibitoren häufig auftreten und schwierig zu beseitigen sind (Ieven *et al.*, 1997), sollte ihr Einfluß auf die PCR nicht unberücksichtigt bleiben. Als Methode der Wahl zum Ausschluß von PCR-Inhibitionen gilt der Zusatz eines sog. „internen Standards“ (Kontroll-DNA) als Amplifikationskontrolle.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Amplifikationskontrolle wurde von der Ziel-DNA-Sequenz abgeleitet. Um für den PCR-Nachweis möglichst gleiche Amplifikationsbedingungen von Wildtyp- und Kontroll-DNA zu gewährleisten, wurde in das 250 bp lange *Francisella* spezifische Amplifikat mittels PCR-Mutagenese eine Substitution eingefügt (vgl. Abb. 2-2). Durch die gestellten Anforderungen (vgl. 3.2.2.2B) sollte eine vergleichbare Amplifikationseffizienz beider Nukleinsäuren erzielt werden. Dass diese Voraussetzung gewährleistet ist, wurde in 3.2.3.3.B gezeigt.

Johansson *et al.* (2000) verwendet als internen Standard ebenfalls eine exogene Sequenz. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren leitet Johansson *et al.* (2000) den internen Standard von einer Sequenz aus *Pseudomonas sp.* ab. Ferner weisen Wildtyp- und Kontroll-DNA eine unterschiedliche Länge auf, werden aber mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert.

Dies ermöglicht die Differenzierung beider Amplifikate im Agarosegel anhand ihrer Größe. Beide Nukleinsäuren werden mit der gleichen Amplifikationseffizienz vervielfältigt.

Eine vergleichbare Amplifikationseffizienz ist Voraussetzung dafür, dass eine Quantifizierung der Wildtyp-DNA unter Verwendung des internen Standards als Referenzmarke durchgeführt werden kann. Bisher wurde die Amplifikationseffizienz des für den Nachweis von *F. tularensis* etablierten Systems nur grob verglichen. Nach den in 3.2.3.3 gezeigten Ergebnissen ist das hier etablierte kompetitive PCR-System geeignet zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Darüber hinaus gelten die unter 3.3.3.3 aufgeführten Einschränkungen bezüglich einer potentiellen Quantifizierung.

Johansson *et al.* (2000) setzt die etablierte kompetitive PCR ebenfalls zur Quantifizierung ein. Durch den Vergleich der Amplifikate von Standard- und Wildtyp-DNA im Agarosegel schließt er auf die vorhandenen Menge an 16S rDNA.

Auch das von Higgins *et al.* (2000) etablierte Taqman™ PCR-System ist für die Quantifizierung geeignet. Wie bereits in 3.3.3.3 diskutiert, erscheint für eine exakte Quantifizierung auch bei Taqman™ Systemen die Zugabe einer internen Standard-DNA notwendig.

3.3.5 NACHWEISSYSTEM FÜR ORTHOPOCKENVIREN

Orthopocken spezifische PCR-Nachweissysteme basieren auf der Amplifikation unterschiedlicher Gene, wie z.B. *HA* (Ibrahim *et al.*, 1997 bzw. 1998; Ropp *et al.*, 1995), *ATI* (Czerny *et al.*, 1997; Neubauer *et al.*, 1998), *TK* bzw. *ATIP* Gen (Sandvik *et al.*, 1998) oder 14-kDa Fusionsprotein (Meyer, pers. comm. 1998) (vgl. auch Tabelle 2-3). Im Wesentlichen unterscheiden sich diese PCR-Systeme in ihrer Spezifität und Sensitivität.

3.3.5.1 Spezifität

Die Spezifität eines PCR-Systems hängt davon ab, wie gut die Primer im Vergleich zu unspezifischen Abschnitten der Matrize an die Ziel-DNA hybridisieren. Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierte Genregion liegt innerhalb des 14 kDa Fusionsprotein Gens. Die verwendeten Primer (Meyer, pers. comm. 1998) sind spezifisch für die Gattung Orthopockenviren, wie durch Untersuchungen mit ca. 50 verschiedenen Spezies gezeigt werden konnte. Die Spezifität innerhalb der Gattung, die mit 8 verschiedenen Isolaten getestet wurde, lag mit den verwendeten

Amplifikationsprimern bei 100 %. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen Spezies bzw. Gruppen ist unter Verwendung einzelner Sonden statt des verwendeten Sondengemisches im ELISA denkbar.

Meyer (1998) zeigt den spezifischen Nachweis aller verschiedenen Orthopockenviren über ein 280 bp Fragment des 14 kDa Fusionsprotein Gens, außer für zwei Spezies (Raccoon und Vole Poxvirus), bei denen unwesentlich größere Amplifikate erhalten werden. Ferner wird Skunk Poxvirus nicht nachgewiesen. Isolate von Skunk bzw. Vole Poxvirus lagen für die eigenen Untersuchungen nicht vor. Abgesehen davon konnten die Ergebnisse von Meyer (1998) für das verwendete Primerpaar 14-up/14-low durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Ein Genus spezifisches System zum Nachweis von Orthopockenviren beschreibt Czerny *et al.* (1997). Auch bei diesem System weisen die Amplifikate je nach Spezies Unterschiede in der Länge auf. Zur Differenzierung einzelner Spezies wurden die erhaltenen Amplifikate einer „restriction fragment length polymorphism“ (RFLP) Analyse unterzogen. Ebenso verfahren Meyer *et al.* (1994) und Ropp *et al.* (1995). Auch Ibrahim *et al.* (1997) amplifiziert Orthopockenviren DNA mit Genus spezifischen Primern. Die Identifizierung einzelner Spezies wird hier unter Verwendung von fluorogenen Sonden erreicht. Diese Methode erlaubt eine einfache und schnelle Differenzierung der Orthopockenviren.

Neubauer *et al.* (1998) beschreibt ein Spezies spezifisches Nachweissystem für Affenpockenviren. Die verwendeten Primer sind spezifisch für die Affenpockenviren, was durch Untersuchungen mit 15 verschiedenen Orthopockenviren Isolaten anderer Spezies gezeigt werden konnte. Die Spezifität bezüglich der Affenpockenviren, die mit 19 verschiedenen Isolaten getestet wurde, lag mit bei 100 %.

3.3.5.2 Sensitivität

In Abhängigkeit von zwei Nachweismethoden wurde die Nachweisgrenze der PCR für Orthopockenviren DNA ermittelt. Der Nachweis von Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA war jeweils mit einer Nachweisgrenze von 10 fg an initial in die PCR eingesetzter DNA möglich. Bei einem Molekulargewicht von $1,22 \times 10^8$ g/mol für Vaccinia Virus (Kimball, 1988) entspricht diese DNA Menge ca. 50 Genomäquivalenten.

In der Literatur wurde bei den meisten der zitierten PCR-Systeme zum Nachweis der Orthopockenviren (vgl. Tabelle 2-3) keine Nachweisgrenze der Systeme bestimmt. Sandvik *et al.* (1998) gibt 1 pg genomische Vaccinia Virus DNA als Nachweisgrenze der PCR an. Kombiniert mit Blotting oder Hybridisierung konnte die Nachweisgrenze

um das 100-fache auf 10 fg gesteigert werden. Dies zeigt wiederum (vgl. 3.3.3.2) den Einfluß der Detektionsmethode auf die Sensitivität des Nachweises.

3.3.5.3 Amplifikationskontrolle

Um den Einfluß von Inhibitoren auf die PCR nicht unberücksichtigt zu lassen, sollte eine Amplifikationskontrolle in PCR-Systemen zum Nachweis von Krankheitserregern verwendet werden.

Die im Rahmen der Etablierung eines Nachweissystems für Orthopockenviren implementierte Amplifikationskontrolle wurde von der Ziel-DNA-Sequenz abgeleitet. Dazu wurde in das 280 bp lange spezifische Amplifikat mittels PCR-Mutagenese eine Substitution eingefügt (vgl. Abb. 2-2). Durch die gewählten Bedingungen (vgl. 3.2.2.2B) sollte eine vergleichbare Amplifikationseffizienz beider Nukleinsäuren erzielt werden. Damit wären die Voraussetzungen für eine Nutzung des internen Standards zur Quantifizierung der Wildtyp-DNA erfüllt. Diese Voraussetzung scheinen jedoch bei dem etablierten System zum Nachweis von Orthopockenviren nur bedingt gegeben zu sein. In 3.2.4.3.B wurde gezeigt, dass die Nachweiseffizienz von Wildtyp- und Standard-DNA differiert. Zwar konnte diese Differenz unter Verwendung von Sonden mit integriertem Spacer vermindert werden, dennoch sind vor dem Einsatz des PCR-ELISA zum Nachweis von Orthopockenviren zur Quantifizierung weitergehende Untersuchungen bezüglich der Amplifikations- und Nachweiseffizienz notwendig. In der Literatur wurden keine weiteren Erklärungsansätze für die im Zusammenhang mit den in diesem System verwendeten Nachweissonden gezeigten Phänomene (vgl. Abb. 3-20, Abb. 3-21 und Abb. 3-24) gefunden.

Es handelt sich bei dem etablierten PCR-ELISA um das erste Nachweissystem mit integrierter Amplifikationskontrolle zum Nachweis von Orthopockenviren.

Ein Vergleich des im Rahmen dieser Arbeit verfolgten Ansatzes zur Implementierung einer Amplifikationskontrolle mit Literaturdaten wurde bereits in Kap. 3.3.3.3 und 3.3.4.3 geführt.

3.3.6 AUSBLICK

Trotz des vermehrten Einsatzes von molekularbiologischen Verfahren zur Diagnostik von Infektionskrankheiten wird die Frage, ob es Zeit ist die Petrischale durch die PCR zu ersetzen, auch weiterhin Thema kontroverser Diskussionen sein. Im Rahmen der Anwendung kultivierungsunabhängiger Nukleinsäureamplifikation zur Diagnostik humanpathogener Erreger stimmen Erwartungen und Realität nicht immer überein.

Ein eindeutiger Vorteil des Nachweises von pathogenen Mikroorganismen ohne vorherige kulturelle Anreicherung durch PCR-basierte Verfahren liegt in der Möglichkeit, auch nicht kultivierbare aber infektiöse Mikroorganismen nachzuweisen. Nachteilig wirkt sich jedoch der Nachweis nicht vermehrungsfähiger bzw. toter Mikroorganismen beispielsweise bei Untersuchungen von Bodenproben aus (Scheu, 1999). Ferner kann eine sehr hohe Sensitivität eines Nachweises auch dazu führen, dass kolonialisierende Krankheitserreger bereits detektiert werden, obwohl in dieser Konzentration keine Gefahr für den Ausbruch einer Krankheit besteht (Sintchenko *et al.*, 1999).

Verschiedene Verfahren zur Unterscheidung von lebenden und toten Mikroorganismen werden bereits angewendet. In wie weit diese für einen Einsatz in der Routinediagnostik geeignet sind, ist in den meisten Fällen noch nicht ausreichend untersucht.

Nachdem die Ursachen für falsch positive und falsch negative Ergebnisse einer Nukleinsäureamplifikation verstanden wurden, bieten Nukleinsäureamplifikationsmethoden die Gelegenheit, sich mit einer neuen Sichtweise der mikrobiologischen Diagnose einer Krankheit zu nähern (Sinchenko *et al.*, 1999). Der klinische Wert von kultivierungsunabhängigen Nachweismethoden auf Basis der PCR liegt in der frühzeitigen Identifikation einer Infektion und Einleitung einer geeigneten Behandlung. Um eine valide Aussage zu gewährleisten, ist es notwendig weitere Untersuchungen bezüglich der klinischen Anwendbarkeit sowie vergleichende Studien mit konventionellen Methoden durchzuführen. Anschließend können klare Richtlinien für Kliniker bezüglich Wert und Limitierung der kultivierungsunabhängigen nukleinsäureamplifizierenden Methoden sowie bezüglich der Bedeutung ihrer Ergebnisse erarbeitet werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grundlage der PCR spezifische Nachweissysteme für *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* und Orthopockenviren entwickelt. Dabei ist der Nachweis der hochpathogenen Erreger ohne zusätzliche kulturelle Anzucht möglich. Zum Ausschluß von falsch negativen PCR-Ergebnissen wurde die Amplifikationsreaktion als kompetitive PCR unter Zusatz einer internen Kontroll-DNA als Amplifikationskontrolle etabliert. In Hinblick auf eine mögliche Automatisierbarkeit wurden die Nachweissysteme in Form eines „PCR-ELISA“ konstituiert. Die kolorimetrische Detektion der Amplifikate erfolgt dabei in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten. Dazu wurden für die einzelnen Nachweissysteme biotinylierte Fangsonden sowohl für die interne Kontroll-DNA (ST) als auch für die Erreger spezifische Wildtyp-DNA (WT) entwickelt. Bei der Anwendung dieser Nachweissysteme im klinischen Labor wird empfohlen, das Risiko für eine Kontamination im Verlauf der Durchführung der PCR-ELISA durch die routinemäßige Anwendung des getesteten Dekontaminationsverfahrens mittels UNG zu minimieren.

Der entwickelte PCR-ELISA zum Nachweis von *C. burnetii*, dem Erreger von Q-Fieber, basiert auf der Amplifikation eines 678 bp Abschnittes des *TUL4* Gens. Die Spezifität des Systems liegt mit den erstmals von Willems *et al.* (1994) verwendeten Primern Trans1/Trans2-Dig bei 100 %. Unabhängig von dem verwendeten DNA-Nachweis-system wird eine Nachweisgrenze zwischen null und einer Zelle pro Reaktion erreicht. Als zusätzliche Spezifitätskontrolle und zur Unterscheidung von Wildtyp- und Standardsignal wird die kolorimetrische Detektion nach dem Prinzip des ELISA eingesetzt. Als optimale Konzentration der internen Kontroll-DNA zur Vermeidung von falsch negativen Signalen (Amplifikationskontrolle) werden 250 ag festgesetzt. Da für die Wildtyp- und Kontroll-DNA eine vergleichbare Amplifikationseffizienz ermittelt wurde, ist eine Quantifizierung der Erreger-DNA mit dem etablierten Nachweissystem möglich.

F. tularensis wird mit dem etablierten PCR-ELISA Nachweissystem spezifisch nachgewiesen. Das System basiert auf einer PCR nach Long *et al.* (1993), mit der nach eigenen Untersuchungen *F. tularensis* nicht spezifisch nachgewiesen werden konnte. Neben *F. tularensis* werden in der PCR auch nach Optimierung des Protokolls die Spezies *F. novicida*, *Wolbachia persica*, *Acinetobacter spp.*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* und sporadisch HSV2 im Agarosegel nachgewiesen. Die in die Untersuchungen mit einbezogenen PCR-Systeme nach Junhui *et al.* (1996) bzw. Fulop *et al.* (1996) erschienen nicht geeignet, um das PCR-System nach Long *et al.* (1993) bei der Etablierung des PCR-ELISA Nachweissystems für *F. tularensis* sinnvoll zu ersetzen. Die erforderliche höhere Spezifität des Nachweises konnte über den ELISA implementiert werden. Unter

Verwendung der ausgewählten Wildtyp-Sonde Ft-1-bio im ELISA konnte der Nachweis von *F. novicida* ausgeschlossen werden, obwohl im Amplifikatbereich eine Sequenzhomologie von ca. 99 % zwischen *F. tularensis* und *F. novicida* besteht. Auch die anderen o.g. Spezies wurden im ELISA nicht detektiert. Damit weist dieser etablierte PCR-ELISA gegenüber den getesteten konventionellen PCR-Systemen eine deutlich höhere Spezifität auf. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 fg an initial in die PCR eingesetzter genomischer DNA bzw. ca. 50 Genomäquivalenten von *Francisella tularensis*. Als optimale Konzentration der Amplifikationskontrolle werden 10 ag festgesetzt. Eine Quantifizierung der Erreger-DNA mit dem etablierten Nachweissystem ist grundsätzlich möglich, nachdem für Wildtyp- und Kontroll-DNA eine vergleichbare Amplifikationseffizienz ermittelt wurde.

Das Genus spezifische Nachweissystem zur Detektion von Orthopockenviren basiert auf der Amplifikation eines Sequenzbereiches innerhalb des 14 kDa Fusionsprotein Gens. Mit dem verwendeten Primerpaar 14-up-Dig/14-low (Meyer, 1998) liegt die Spezifität des Nachweises bei 100 %. Dies konnte durch Untersuchungen mit ca. 50 verschiedenen Spezies sowie 8 Orthopockenviren Isolaten gezeigt werden. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen Spezies bzw. Gruppen innerhalb der Orthopockenviren ist unter Verwendung einzelner Sonden im ELISA statt des verwendeten SONDENGEMISCHES von 4 Wildtyp-Sonden denkbar. Der Nachweis von Amplifikaten im Agarosegel und nach dem Prinzip des ELISA ist jeweils mit einer Nachweisgrenze von 10 fg bzw. ca. 50 Genomäquivalenten möglich. Der ELISA wird als zusätzliche Spezifitätskontrolle und zur Unterscheidung von Wildtyp- und Standard-Signal eingesetzt. Als Amplifikationskontrolle werden 100 ag Kontroll-DNA Fragment verwendet. Zur optimalen Detektion sollten im ELISA die Wildtyp-Sonden mit Spacer in Kombination mit der Standard-Sonde ohne Spacer verwendet werden. Da für Wildtyp- und Kontroll-DNA keine vergleichbare Amplifikationseffizienz ermittelt werden konnte, ist eine Quantifizierung der Erreger-DNA mit dem etablierten Nachweissystem nur unter Berücksichtigung dieser Differenz möglich.

Mit allen drei Systemen ist ein Nachweis der Erreger innerhalb eines Arbeitstages möglich. Für den Spezies spezifischen Nachweis von *F. tularensis* und den Genus spezifischen Nachweis von Orthopockenviren stellen die hier etablierten PCR-ELISA Systeme die erste Entwicklung dieser Art mit integrierter Amplifikationskontrolle bzw. Möglichkeit zur Quantifizierung dar.

5 SUMMARY

In the present work specific systems on the basis of the PCR were developed for the detection of *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* and Orthopoxviruses. The detection of the pathogens is possible without additional cultivation. In order to exclude false-negative PCR results the amplification reaction was established as a competitive PCR in which an internal control DNA is included as an amplification check. With regard to a possible automation the detection-systems were constituted in form of a „PCR ELISA“. The colorimetric detection of the amplicons takes place thereby in streptavidin coated microtiter plates. For each system biotinylated capture probes for both the internal control DNA (ST) and the pathogen specific DNA (WT) have been developed. For the use of these proof systems in the clinical laboratory, the routine application of the tested decontamination procedure by means of UNG during the execution of the PCR ELISA is recommended.

The developed PCR ELISA for the detection of *C. burnetii*, the pathogen of Q-fever, is based on the amplification of a 678 bp section of the *TUL4* gene. The specificity of the system is 100 % using the primers Trans1/Trans2-Dig first described by Willems *et al.* (1994). Independent of the used DNA test system a detection limit between zero and a cell per reaction is achieved. As an additional specificity check and for the distinction between wild-type and standard specific signal the colorimetric detection by ELISA is used generally. As an optimal concentration of the control DNA in order to avoid false-negative signals (amplification control) 250 ag was determined. Since for the wild-type and control DNA comparable amplification efficiencies were determined, a quantification of the pathogen DNA with the established system is possible.

F. tularensis is detected specifically with the established PCR ELISA system. The system is based on a PCR described by Long *et al.* (1993), with which in our own investigations *F. tularensis* could not be detected specifically. Even after optimization of the PCR procedure, in addition to *F. tularensis* the species *F. novicida*, *Wolbachia persica*, *Acinetobacter spp.*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* and sporadically HSV2 are detected in an agarose gel. The alternative PCR systems of Junhui *et al.* (1996) and Fulop *et al.* (1996), which were also tested in our investigations, proved not to be suitable replacements for that of Long *et al.* in the development of the PCR ELISA detection system for *F. tularensis*. The necessary higher specificity of the test system could be implemented through the ELISA. Using the selected wild-type probe Ft-1-bio in the ELISA the detection of *F. novicida* could be excluded, although within the amplified region a sequence homology of approx. 99 % between *F. tularensis* and *F. novicida* exists. Thus the established PCR ELISA

indicates a clearly higher specificity in relation to the tested conventional PCR systems. The detection limit is 100 fg of genomic DNA initially utilized in the PCR or approx. 50 genome equivalents of *Francisella tularensis*. As an optimal concentration of the amplification control 10 ag was determined. A quantification of the pathogen DNA with the established system is possible after a comparable amplification efficiency has been determined for wild-type and control DNA.

The Genus specific system for the detection of Orthopoxviruses is based on the amplification of a sequence area within a 14 kDa fusion protein gene. With the used pair of primers 14-up-Dig/14-low (Meyer, 1998) the specificity of the system is 100 %. This could be shown in investigations with approx. 50 different species as well as 8 Orthopoxvirus isolates. A differentiation between different species or groups within the Orthopoxviruses is conceivable using individual probes in the ELISA instead of the probe mixture of 4 wild-type probes used here. The detection of amplicons in an agarose gel and by ELISA is possible with a detection limit of 10 fg or approx. 50 genome equivalents in each case. Colorimetric detection according to the ELISA principle is used generally since it allows additional specificity and the distinction of wild-type and standard signal. As an amplification control 100 ag control DNA fragment are used. For optimal detection in the ELISA the wild-type probes with spacer should be used in combination with the standard probe without spacer. Since for wild type and control DNA no comparable amplification efficiency was determined, a quantification of the pathogen DNA with the established system is possible only with consideration of this difference.

For all three systems a detection of the pathogens is possible within one working day. For the species specific detection of *F. tularensis* and the genus specific detection of Orthopoxviruses the PCR ELISA systems established here represent the first developments of this type with integrated amplification control and potential for quantification.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAVAYA K., ESPING C., HOENLE R., GORZOWSKI J., PERRY R., KROEGER P., ROBINSON J. & FLANDERS R. (2000) Performance of a multiplex qualitative PCR LCx assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M subtypes, group O, and HIV-2. *J Clin Microbiol* **38**, 716-723.
- AL-SOUD W.A. & RADSTROM P. (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3748-3753.
- ALLMANN M., HOFLEIN C., KOPPEL E., LUTHY J., MEYER R., NIEDERHAUSER C., WEGMULLER B. & CANDRIAN U. (1995) Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res Microbiol* **146**, 85-97.
- ATLAS, R. M. AND BEJ, A. K. (1993) Polymerase Chain Reaction. in: *Methods for General and molecular Bacteriology*, Gerhardt, P., Ed., American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC , 418.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E. & ET AL. (1991) Current Protocols in Molecular biology. *Greene Publishing Associates and Wiley Interscience*, New York
- BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996) The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol Cell Probes* **10**, 159-164.
- BARRY T., POWELL R. & GANNON F. (1990) A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Biotechnology (N Y)* **8**, 233-236.
- BAUMFORTH K.R., NELSON P.N., DIGBY J.E., O'NEIL J.D. & MURRAY P.G. (1999) Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol* **52**, 1-10.
- BAXBY D. (1988) Human poxvirus infection after the eradication of smallpox. *Epidemiol Infect* **100**, 321-334.
- BEJ A.K., STEFFAN R.J., DICESARE J., HAFF L. & ATLAS R.M. (1990) Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* **56**, 307-314.

- BEJ A.K., MCCARTY S.C. & ATLAS R.M. (1991) Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2429-2432.
- BEJ A.K., DICESARE J.L., HAFF L. & ATLAS R.M. (1991) Detection of *Escherichia coli* and *Shigella spp.* in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1013-1017.
- BEJ A.K., PATTERSON D.P., BRASHER C.W., VICKERY M.C., JONES D.D. & KAYSNER C.A. (1999) Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* **36**, 215-225.
- BERDAL B.P., MEHL R., HAAHEIM H., LOKSA M., GRUNOW R., BURANS J., MORGAN C. & MEYER H. (2000) Field detection of *Francisella tularensis*. *Scand J Infect Dis* **32**, 287-291.
- BERRI M., LAROUCAU K. & RODOLAKIS A. (2000) The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* **72**, 285-293.
- BESSESEN M.T., LUO Q.A., ROTBART H.A., BLASER M.J. & ELLISON R.T. (1990) Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2930-2932.
- BEYER W., GLOCKNER P., OTTO J. & BOHM R. (1995) A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiol Res* **150**, 179-186.
- BUCKLAND, R. M. (1986) Strong signals from Streptavidin-biotin. *Nature* **320**, 557-558.
- CANO R.J., RASMUSSEN S.R., SANCHEZ F.G. & PALOMARES J.C. (1993) Fluorescent detection-polymerase chain reaction (FD-PCR) assay on microwell plates as a screening test for *salmonellas* in foods. *J Appl Bacteriol* **75**, 247-253.
- CARO A., GOT P., LESNE J., BINARD S. & BALEUX B. (1999) Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3229-3232.

- CHIU C.H. & OU J.T. (1996) Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* **34**, 2619-2622.
- CHOSA H., MAKINO S., SASAKAWA C., OKADA N., YAMADA M., KOMATSU K., SUK J.S. & YOSHIKAWA M. (1989) Loss of virulence in *Shigella* strains preserved in culture collections due to molecular alteration of the invasion plasmid. *Microb Pathog* **6**, 337-342.
- CIMINO G.D., METCHETTE K., ISAACS S.T. & ZHU Y.S. (1990) More false-positive problems. *Nature* **345**, 773-774.
- COLWELL R.R. (1996) Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**, 2025-2031.
- CONE R.W. & FAIRFAX M.R. (1993) Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination. *PCR Methods Appl* **3**, S15-S17
- COURTNEY B.C., SMITH M.M. & HENCHAL E.A. (1999) Development of internal controls for probe-based nucleic acid diagnostic assays. *Anal Biochem* **270**, 249-256.
- CZERNY C. P., JOHANN S., HOLZLE L., AND MEYER H.. (1994) Epitope detection in the envelope of intracellular naked orthopox viruses and identification of encoding genes. *Virology* **200** (2):764-777.
- CZERNY C.P., ZELLER-LUE C., EIS-HUBINGER A.M., KAADEN O.R. & MEYER H. (1997) Characterization of a cowpox-like orthopox virus which had caused a lethal infection in man. *Arch Virol Suppl* **13**, 13-24.
- DENEER H.G. & BOYCHUK I. (1991) Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl Environ Microbiol* **57**, 606-609.
- DENIS M., SOUMET C., LEGEAY O., ARNAULD C., BOUNAIX S., THIERY R. & JESTIN A. (1997) Development of a semiquantitative PCR assay using internal standard and colorimetric detection on microwell plate for pseudorabies virus. *Mol Cell Probes* **11**, 439-448.
- DERRICK, E. H. (1939) *Rickettsia burnetii*: The cause of "Q" fever. *Med.J.Aust.* **1**, 14.
- DOLAN S.A., DOMMARAJU C.B. & DEGUZMAN G.B. (1998) Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* **26**, 764-765.

- DON R.H., COX P.T., WAINWRIGHT B.J., BAKER K. & MATTICK J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008
- DURISIN M.D., IBRAHIM A. & GRIFFITHS M.W. (1998) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using a digoxigenin labelled probe targeting the *yst* gene. *J Appl Microbiol* **84**, 285-292.
- EDINGLOH M., MERCK C.C. & MANZ E. (1999) Multiplex PCR for the diagnostic detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **112**, 5-9.
- ERMEL R.W. (1999) Improved detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) in livestock tissue through silica matrix DNA extraction and high-sensitivity PCR. *Lab Anim Sci* **49**, 474-475.
- EVERS, H.-D. AND PRIEWER, H. (1999) Wehrmedizinische Forschung in der Bundeswehr. *Soldat und Technik* (**2**), 113-115.
- FERRE, F. (1992) Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Applic.* (**2**), 1-9.
- FITTS R., DIAMOND M., HAMILTON C. & NERI M. (1983) DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella spp.* in foods. *Appl Environ Microbiol* **46**, 1146-1151.
- FORSMAN M., SANDSTROM G. & SJOSTEDT A. (1994) Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella strains* and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 38-46.
- FRAZIER M.E., MALLAVIA L.P., SAMUEL J.E. & BACA O.G. (1990) DNA probes for the identification of *Coxiella burnetii* strains. *Ann N Y Acad Sci* **590**, 445-458.
- FRAZIER M.E., HEINZEN R.A., MALLAVIA L.P. & BACA O.G. (1992) DNA probes for detecting *Coxiella burnetii* strains. *Acta Virol* **36**, 83-89.
- FRIEDHOFF P., HAHN M., WOLFES H. & PINGOUD A. (1993) Quantitative polymerase chain reaction with oligodeoxynucleotide ligation assay/enzyme-linked immunosorbent assay detection. *Anal Biochem* **215**, 9-16.
- FRITZ E., THIELE D., WILLEMS H. & WITTENBRINK M.M. (1995) Quantification of *Coxiella burnetii* by polymerase chain reaction (PCR) and a colorimetric microtiter plate hybridization assay (CMHA). *Eur J Epidemiol* **11**, 549-557.

- FULOP M., LESLIE D. & TITBALL R. (1996) A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **54**, 364-366.
- FURUYA Y., YOSHIDA Y., KATAYAMA T., KAWAMORI F., YAMAMOTO S., OHASHI N., TAMURA A. & KAWAMURA A.J. (1991) Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**, 2628-2630.
- GILGEN M., HUBNER P., HOFELEIN C., LUTHY J. & CANDRIAN U. (1998) PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res Microbiol* **149**, 145-154.
- GOMEZ-LUCIA E., GOYACHE J., ORDEN J.A., BLANCO J.L., RUIZ S.Q.J., DOMINGUEZ L. & SUAREZ G. (1989) Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1447-1451.
- GOPO J.M., MELIS R., FILIPSKA E., MENEVERI R. & FILIPSKI J. (1988) Development of a *Salmonella*-specific biotinylated DNA probe for rapid routine identification of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* **2**, 271-279.
- GRUNOW R., SPLETTSTOESSER W., MCDONALD S., OTTERBEIN C., O'BRIEN T., MORGAN C., ALDRICH J., HOFER E., FINKE E.J. & MEYER H. (2000) Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 86-90.
- GUALILLO O., BISCARDI D., DI CARLO R. & DE FUSCO R. (1999) Simple method of detecting enteroviruses in contaminated molluscs and sewage by using polymerase chain reaction coupled with a colorimetric microwell detection assay. *Sci Total Environ* **243-244**, 285-289.
- GUTIERREZ R., GARCIA T., GONZALEZ I., SANZ B., HERNANDEZ P.E. & MARTIN R. (1998) Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Lett Appl Microbiol* **26**, 372-376.
- HAHN M., DORSAM V., FRIEDHOFF P., FRITZ A. & PINGOUD A. (1995) Quantitative polymerase chain reaction with enzyme-linked immunosorbent assay detection of selectively digested amplified sample and control DNA. *Anal Biochem* **229**, 236-248.

- HIGGINS J.A., HUBALEK Z., HALOUZKA J., ELKINS K.L., SJOSTEDT A., SHIPLEY M. & IBRAHIM M.S. (2000) Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 310-318.
- HIGUCHI R. (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. *in: Ehrlich, H.A., PCR technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York, 31-38.*
- HINRICHS U., VAN DE POEL H. & VAN d., I (1999) Necrotizing pneumonia in a cat caused by an orthopox virus. *J Comp Pathol* **121**, 191-196.
- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R. & GELFAND D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7276-7280.
- HOLT, J. editor-in-chief. (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. First Edition (Vol. 1-4). Williams & Williams, Baltimore MD.*
- HOOVER T.A., VODKIN M.H. & WILLIAMS J.C. (1992) A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol* **174**, 5540-5548.
- IBELGAUFTS, H. (1993) *Gentechnologie von A bis Z. VCH New York, Basel, Cambridge*
- IBRAHIM A., LIESACK W., PIKE S. & STACKEBRANDT E. (1992) The polymerase chain reaction: an epidemiological tool to differentiate between two clusters of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *FEMS Microbiol Lett* **76**, 63-66.
- IBRAHIM A., NORLANDER L., MACELLARO A. & SJOSTEDT A. (1997) Specific detection of *Coxiella burnetii* through partial amplification of 23S rDNA. *Eur J Epidemiol* **13**, 329-334.
- IBRAHIM M.S., ESPOSITO J.J., JAHRLING P.B. & LOFTS R.S. (1997) The potential of 5' nuclease PCR for detecting a single-base polymorphism in Orthopoxvirus. *Mol Cell Probes* **11**, 143-147.
- IBRAHIM M.S., LOFTS R.S., JAHRLING P.B., HENCHAL E.A., WEEDN V.W., NORTHRUP M.A. & BELGRADER P. (1998) Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA. *Anal Chem* **70**, 2013-2017.

- IEVEN M. & GOOSSENS H. (1997) Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* **10**, 242-256.
- JACOB J., MARTIN W. & HOLLER C. (1993) Characterization of viable but nonculturable stage of *E. coli*, characterized with respect to electron microscopic findings, whole cell protein and lipooligosaccharide (LOS) patterns. *Zentralbl Mikrobiol* **148**, 3-10.
- JAGER C., WILLEMS H., THIELE D. & BALJER G. (1998) Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol Infect* **120**, 157-164.
- JIN C.F., MATA M. & FINK D.J. (1994) Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl* **3**, 252-255.
- JOHANSSON A., BERGLUND L., ERIKSSON U., GORANSSON I., WOLLIN R., FORSMAN M., TARNVIK A. & SJOSTEDT A. (2000) Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* **38**, 22-26.
- JOHANSSON A., BERGLUND L., ERIKSSON U., GORANSSON I., WOLLIN R., FORSMAN M., TARNVIK A. & SJOSTEDT A. (2000) Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* **38**, 22-26.
- JOHNSON J.R. & O'BRYAN T.T. (2000) Improved Repetitive-Element PCR Fingerprinting for Resolving Pathogenic and Nonpathogenic Phylogenetic Groups within *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 265-273.
- JOHNSON S.R., MARTIN D.H., CAMMARATA C. & MORSE S.A. (1995) Alterations in sample preparation increase sensitivity of PCR assay for diagnosis of chancroid. *J Clin Microbiol* **33**, 1036-1038.
- JONAS D., ROSENBAUM A., WEYRICH S. & BHAKDI S. (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* **33**, 1247-1252.
- JUNHUI Z., RUIFU Y., JIANCHUN L., SONGLE Z., MEILING C., FENGXIANG C. & HONG C. (1996) Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* **45**, 477-482.

- KATO K., ARASHIMA Y., ASAI S., FURUYA Y., YOSHIDA Y. , MURAKAMI M., TAKAHASHI Y., HAYASHI K., KATAYAMA T., KUMASAKA K., ARAKAWA Y. & KAWANO K. (1998) Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**, 139-144.
- KAYSER, F. H. (1989) Medizinische Mikrobiologie; Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie. 7. überarb.u.erw.Aufl. *Thieme-Stuttgart*.
- KELLER G.H., HUANG D.P., SHIH J.W. & MANAK M.M. (1990) Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* **28**, 1411-1416.
- KELLER G.H., HUANG D.P. & MANAK M.M. (1991) Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA by polymerase chain reaction amplification and capture hybridization in microtiter wells. *J Clin Microbiol* **29**, 638-641.
- KESSLER H.H., PIERER K., WEBER B., SAKRAUSKI A., SANTNER B., STUENZNER D., GERGELY E. & MARTH E. (1994) Detection of herpes simplex virus DNA from cerebrospinal fluid by PCR and a rapid, nonradioactive hybridization technique. *J Clin Microbiol* **32**, 1881-1886.
- KIMBALL, I. AND PAUL C. (1988) Virology. *Prentice-Hall*, New Jersey.
- KOLK A.H., NOORDHOEK G.T., DE LEEUW O., KUIJPER S. & VAN EMBDEN J.D. (1994) *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *J Clin Microbiol* **32**, 1354-1356.
- KOSKINIEMI M., MANNONEN L., KALLIO A. & VAHERI A. (1997) Luminometric microplate hybridization for detection of varicella-zoster virus PCR product from cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* **63**, 71-79.
- KOX L.F., RHIENTHONG D., MIRANDA A.M., UDOMSANTISUK N., ELLIS K., VAN LEEUWEN J., VAN HEUSDEN S., KUIJPER S. & KOLK A.H. (1994) A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* **32**, 672-678.

- KOX L.F., NOORDHOEK G.T., KUNAKORN M., MULDER S., STERRENBURG M. & KOLK A.H. (1996) Microwell hybridization assay for detection of PCR products from *Mycobacterium tuberculosis* complex and the recombinant *Mycobacterium smegmatis* strain 1008 used as an internal control. *J Clin Microbiol* **34**, 2117-2120.
- KREADER C.A. (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1102-1106.
- KUNAKORN M., RAKSAKAI K., PRACHARKTAM R. & SATTAUDOM C. (1999) Overcoming the errors of in-house PCR used in the clinical laboratory for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **30**, 84-90.
- KWOK S. & HIGUCHI R. (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**, 237-238.
- LAGE A.P., FAUCONNIER A., BURETTE A., GLUPCZYNSKI Y., BOLLEN A. & GODFROID E. (1996) Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **34**, 530-533.
- LANDGRAF A., RECKMANN B. & PINGOUD A. (1991) Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem* **198**, 86-91.
- LANDGRAF A., RECKMANN B. & PINGOUD A. (1991) Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Anal Biochem* **193**, 231-235.
- LANTZ P.G., TJERNELD F., BORCH E., HAHN-HAGERDAL B. & RADSTROM P. (1994) Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3416-3418.
- LANTZ P.G., KNUTSSON R., BLIXT Y., AL SOUD W.A., BORCH E. & RADSTROM P. (1998) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int J Food Microbiol* **45**, 93-105.
- LEAR W., MCDONNELL M., KASHYAP S. & BOER P.H. (1995) Random primer p(dN)6-digoxigenin labeling for quantitation of mRNA by Q-RT-PCR and ELISA. *Biotechniques* **18**, 78-3.

- LEE H.F., YE H.H., HSIAO H.L., WANG T.K. & LIU C.H. (1993) Detection and identification of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains by a simplified polymerase chain reaction method. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih* **26**, 6-14.
- LIE Y.S. & PETROPOULOS C.J. (1998) Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 43-48.
- LISBY, G. (1999) Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Mol.Biotechnol.* **12**(1), 75-99.
- LONG G.W., OPRANDY J.J., NARAYANAN R.B., FORTIER A.H., PORTER K.R. & NACY C.A. (1993) Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**, 152-154.
- LONGO M.C., BERNINGER M.S. & HARTLEY J.L. (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**, 125-128.
- LORENZ H., JAGER C., WILLEMS H. & BALJER G. (1998) PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4234-4237.
- LUK J.M., KONGMUANG U., TSANG R.S. & LINDBERG A.A. (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D *salmonellae*: a rapid screening prototype. *J Clin Microbiol* **35**, 714-718.
- LUNEBERG E., JENSEN J.S. & FROSCH M. (1993) Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. *J Clin Microbiol* **31**, 1088-1094.
- MAASS M., BARTELS C., ENGEL P.M., MAMAT U. & SIEVERS H.H. (1998) Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **31**, 827-832.
- MAHABUBANI, M. H. AND BEJ, A. K. (1994) Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. in Griffin, L.G.& Griffin, A.M., ed. PCR technology: current innovations. *CRC Press*, Boca Raton
- MAHNEL H. (1991) [Catpox in Germany]. *Tierarztl Prax* **19**, 419-422.

- MAIWALD M., KISSEL K., SRIMUANG S., VON KNEBEL D. & SONNTAG H.G. (1994) Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *legionellas* in hospital water samples. *J Appl Bacteriol* **76**, 216-225.
- MALLAVIA L.P., WHITING L.L., MINNICK M.F., HEINZEN R., RESCHKE D., FOREMAN M., BACA O.G. & FRAZIER M.E. (1990) Strategy for detection and differentiation of *Coxiella burnetii* strains using the polymerase chain reaction. *Ann N Y Acad Sci* **590**, 572-581.
- MARIANI B.D., LEVINE M.J., BOOTH R.E.J. & TUAN R.S. (1995) Development of a novel, rapid processing protocol for polymerase chain reaction-based detection of bacterial infections in synovial fluids. *Mol Biotechnol* **4**, 227-237.
- MATTHEWS R.C. & BURNIE J.P. (1992) Clinical applications of molecular biology to diagnostic microbiology. *J Clin Pathol* **45**, 465-467.
- MATTINGLY J.A., BUTMAN B.T., PLANK M.C., DURHAM R.J. & ROBISON B.J. (1988) Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J Assoc Off Anal Chem* **71**, 679-681.
- MAUEL M.J., CARLTON S.J. & MATHER T.N. (1999) Polymerase chain reaction detection efficiency of the human granulocytic ehrlichiosis agent (*Rickettsiaceae: Ehrlichieae*) in ticks (Acari: Ixodidae) is dependent on the DNA extraction method. *J.Med.Entomol.* **36**, 649-652.
- MCKAY, A. M. (1992) Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Letters Appl.Microbiol.* **14**, 129-135.
- MEYER H., OSTERRIEDER N. & CZERNY C.P. (1994) Identification of binding sites for neutralizing monoclonal antibodies on the 14-kDa fusion protein of orthopox viruses. *Virology* **200**, 778-783.
- MEYER H., PFEFFER M. & RZIHA H.J. (1994) Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of Orthopoxvirus species by polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **75 (Pt 8)**, 1975-1981.
- MEYER, H. (1998) PCR System Orthopockenviren. [Personal Communication]

- MOLLER A. & JANSSON J.K. (1997) Quantification of genetically tagged cyanobacteria in Baltic Sea sediment by competitive PCR. *Biotechniques* **22**, 512-518.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G. & ERLICH H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- MULLIS K.B. & FALOONA F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- MURAMATSU Y., MARUYAMA M., YANASE T., UENO H. & MORITA C. (1996) Improved method for preparation of samples for the polymerase chain reaction for detection of *Coxiella burnetii* in milk using immunomagnetic separation. *Vet Microbiol* **51**, 179-185.
- MURAMATSU Y., YANASE T., OKABAYASHI T., UENO H. & MORITA C. (1997) Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2142-2146.
- NAGAI M., YOSHIDA A. & SATO N. (1998) Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 157-163.
- NAKAJIMA H., INOUE M., MORI T., ITOH K., ARAKAWA E. & WATANABE H. (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J Clin Microbiol* **30**, 2484-2486.
- NEUBAUER H., PFEFFER M. & MEYER H. (1997) Specific detection of mousepox virus by polymerase chain reaction. *Lab Anim* **31**, 201-205.
- NEUBAUER H., REISCHL U., ROPP S., ESPOSITO J.J., WOLF H. & MEYER H. (1998) Specific detection of monkeypox virus by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **74**, 201-207.
- NEWTON, C. R. AND GRAHAM, A. (1994) PCR. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford .
- NGUYEN S.V. & HIRAI K. (1999) Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism

- analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 249-254.
- NIEMEYER C.M., ADLER M. & BLOHM D. (1997) Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. *Anal Biochem* **246**, 140-145.
- NOORDHOEK G.T., KAAAN J.A., MULDER S., WILKE H. & KOLK A.H. (1995) Routine application of the polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Pathol* **48**, 810-814.
- ORTIZ A. & RITTER E. (1996) A rapid method for detecting specific amplified PCR fragments in microtiter plates. *Nucleic Acids Res* **24**, 3280-3281.
- PACHNER, A. R., AMEMIRYA, K., DELANEY, E., O'NEILL, HUGHES, C. A. N, AND ZHANG, W.-F. (1996) Interleucin-6 is expressed at a high level in the CNS in Lyme neuroborreliosis. *Am.Acad.Neurol.* **49**, 147-152.
- PANACCIO M. & LEW A. (1991) PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res* **19**, 1151
- PHILLIPS C.J., PAUL E.A. & PROSSER J.I. (2000) Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiol.Ecol.* **32**, 167-175.
- PINERO J., MARTINEZ E., PACHECO R., ARAGON Z., DE ARMAS F., DEL CASTILLO A. & VALLADARES B. (1999) PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* **73**, 21-29.
- POGGI P.C., GIUNCHEDI L. & BISSANI R. (1997) Specific detection of D- and M-isolates of plum pox virus by immunoenzymatic determination of PCR products. *J Virol Methods* **67**, 127-133.
- POHLE, H. D. (1998) Über die Renaissance der Infektionskrankheiten - Stellgrößen ihres epidemiologischen Wandels zur Jahrhundertwende. *Kieferorthop* **12**, 311-322.
- PSIKAL I., SMID B., KUBALIKOVA R., VALICEK L., RODAK L. & KOSINOVA E. (1997) Colorimetric detection of lagomorphs' calicivirus genomic sequences by polymerase chain reaction incorporating digoxigenin dUTP. *Vet Microbiol* **57**, 55-67.

RAHMAH N., ASHIKIN A.N., ANUAR A.K., ARIFF R.H., ABDULLAH B., CHAN G.T. & WILLIAMS S.A. (1998) PCR-ELISA for the detection of *Brugia malayi* infection using finger-prick blood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**, 404-406.

- RAMISSE V., PATRA G., GARRIGUE H., GUESDON J.L. & MOCK M. (1996) Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* **145**, 9-16.
- RASMUSSEN S.R., LARSEN M.R. & RASMUSSEN S.E. (1991) Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Anal Biochem* **198**, 138-142.
- RKI. (1999) Steckbriefe seltener und "importierter" Infektionserreger.
- ROLOFF, H. (1997) Taxonomische Untersuchungen innerhalb der *Bacillus cereus*-Gruppe mit Hilfe der DNS-DNS Hybridisierungstechnik und der DNS-Amplifikations-Fingerprint-Technik. [Dissertation]
- ROMANOVA L.V. & MISHAN'KIN B.N. (1995) Primers for the genus-specific detection of *Francisella tularensis* in the polymerase chain reaction. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 77-80.
- ROPP S.L., JIN Q., KNIGHT J.C., MASSUNG R.F. & ESPOSITO J.J. (1995) PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol* **33**, 2069-2076.
- ROSENSTRAUS M., WANG Z., CHANG S.Y., DEBONVILLE D. & SPADORO J.P. (1998) An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* **36**, 191-197.
- ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTROM K. & RASMUSSEN O.F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* **17**, 37-45.
- RUF, B. R. AND KERN, W. V. (1999) Infektiologie. *Internist* **40**, 369-380.
- RYS P.N. & PERSING D.H. (1993) Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* **31**, 2356-2360.
- SAIKA R.K. (1989) The design and Optimization of the PCR. in: Ehrlich, H.A., PCR technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York, 7-16.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., AND MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

- SANDVIK T., TRYLAND M., HANSEN H., MEHL R., MOENS U. , OLSVIK O. & TRAAVIK T. (1998) Naturally occurring orthopoxviruses: potential for recombination with vaccine vectors. *J Clin Microbiol* **36**, 2542-2547.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSEN A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- SARKAR G. & SOMMER S.S. (1990) Shedding light on PCR contamination. *Nature* **343**, 27
- SCHEU, P. (1999) Entwicklung eines spezifischen Nachweissystems für *Salmonellen* in Lebensmitteln auf Grundlage der PCR. *Shaker Verlag*, Aachen
- SCHOLL D.R., KAUFMANN C., JOLLIK J.D., YORK C.K., GOODRUM G.R. & CHARACHE P. (1990) Clinical application of novel sample processing technology for the identification of *salmonellae* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* **28**, 237-241.
- SEKEYOVA Z., ROUX V. & RAOULT D. (1999) Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 61-67.
- SHAHAMAT M., MAI U., PASZKO-KOLVA C., KESSEL M. & COLWELL R.R. (1993) Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1231-1235.
- SHAW, J. J., MCCLESKEY, F. K., BENINGA, K. K., REDKAR, R. J., DELVECCIO, V. G., AND GOODE, M. T. (1998) Rapid Detection of Tularemia With Real-Time PCR. *Infect Med* **15**(5), 326-330.
- SINTCHENKO V., IREDELL J.R. & GILBERT G.L. (1999) Is it time to replace the Petri dish with PCR? Application of culture-independent nucleic acid amplification in diagnostic bacteriology: expectations and reality. *Pathology* **31**, 436-439.
- SJOSTEDT A., SANDSTROM G., TARNVIK A. & JAURIN B. (1990) Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. *J Immunol* **145**, 311-317.
- SJOSTEDT A., ERIKSSON U., BERGLUND L. & TARNVIK A. (1997) Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol* **35**, 1045-1048.

- SPYRIDAKI I., GIKAS A., KOFTERIDIS D., PSAROULAKI A. & TSELENTIS Y. (1998) Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *J Clin Microbiol* **36**, 2063-2067.
- SPYRIDAKI I., PSAROULAKI A., ARANSAY A., SCOULICA E. & TSELENTIS Y. (2000) Diagnosis of quinolone-resistant *Coxiella burnetii* strains by PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal* **14**, 59-63.
- STEIN A. & RAOULT D. (1992) A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucleic Acids Res* **20**, 5237-5238.
- STEIN A. & RAOULT D. (1992) Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 2462-2466.
- STEIN A., KRUSZEWSKA D., GOVERNET J. & RAOULT D. (1997) Study of the 16S-23S ribosomal DNA internal spacer of *Coxiella burnetii*. *Eur J Epidemiol* **13**, 471-475.
- STRAUSS, W. M. (1993) Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *in: Ausubel, F.M., ed. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York*
- SYVANEN A.C., BENGTSTROM M., TENHUNEN J. & SODERLUND H. (1988) Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res* **16**, 11327-11338.
- TANIGUCHI A., KOHSAKA H. & CARSON D.A. (1994) Competitive RT-PCR ELISA: a rapid, sensitive and non-radioactive method to quantitate cytokine mRNA. *J Immunol Methods* **169**, 101-109.
- TEBBE C.C. & VAHJEN W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2657-2665.
- THIELE D., WILLEMS H. & KRAUSS H. (1992) New possibilities for the diagnosis of Q fever and for the differentiation of the causative agent. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **105**, 45-49.
- TO H., KAKO N., ZHANG G.Q., OTSUKA H., OGAWA M., OCHIAI O., NGUYEN S.V., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H., NAGAOKA N., AKIYAMA M., AMANO K. & HIRAI K. (1996) Q fever pneumonia in children in Japan. *J Clin Microbiol* **34**, 647-651.

- TO H., HTWE K.K., KAKO N., KIM H.J., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1998) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci* **60**, 859-861.
- TSAI Y.L. & OLSON B.H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2292-2295.
- TSUKANO H., ITOH K., SUZUKI S. & WATANABE H. (1996) Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers. *Microbiol Immunol* **40**, 773-775.
- ULRICH P.P., ROMEO J.M., DANIEL L.J. & VYAS G.N. (1993) An improved method for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma utilizing heminested primers and internal control RNA. *PCR Methods Appl* **2**, 241-249.
- VANDERBORGHT A., VAN DER AA A., GEUSENS P., VANDEVYVER C., RAUS J. & STINISSEN P. (1999) Identification of overrepresented T cell receptor genes in blood and tissue biopsies by PCR-ELISA. *J Immunol Methods* **223**, 47-61.
- VANEECHOUTTE M. & VAN ELDERE J. (1997) The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* **46**, 188-194.
- VEKRIS A., BAUDUER F., MAILLET S., BEBEAR C. & BONNET J. (1995) Improved microplate immunoenzymatic assay of PCR products for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Cell Probes* **9**, 25-31.
- VILA I, DOMINGUEZ ER, AND SZAKACS JG. (1996) Chronic Q fever in an avian pathologist. *Infect Med* **13**(11), 977-981, 988.
- WAHLBERG J., LUNDEBERG J., HULTMAN T. & UHLEN M. (1990) General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6569-6573.
- WHITBY J.E., HEATON P.R., WHITBY H.E., O'SULLIVAN E. & JOHNSTONE P. (1997) Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* **69**, 63-72.
- WHO (1998) The World Health Report 1998 Life in the Twenty-first Century: A Vision for All.
- WHO (1999) The World Health Report 1999 Making a Difference.

- WIDJOJOATMODJO M.N., FLUIT A.C., TORENSMA R., VERDONK G.P. & VERHOEF J. (1992) The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *salmonellae* in fecal samples. *J Clin Microbiol* **30**, 3195-3199.
- WIEDBRAUK D.L., WERNER J.C. & DREVON A.M. (1995) Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol* **33**, 2643-2646.
- WILLEMS H., THIELE D. & KRAUSS H. (1993) Plasmid based differentiation and detection of *Coxiella burnetii* in clinical samples. *Eur J Epidemiol* **9**, 411-418.
- WILLEMS H., THIELE D., FROLICH-RITTER R. & KRAUSS H. (1994) Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralbl Veterinarmed [B]* **41**, 580-587.
- WILSON I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3741-3751.
- WOESE C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- WOODS S.A. & COLE S.T. (1989) A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett* **53**, 305-309.
- WYATT, G. M., LEE, H. A., DIONYSIOU, S., MORGAN, R. A., STOKELY, D. J., HAJJI, A. H, RICHARDS, J., SILLIS, A. J., AND JONES, P. H. (1995) Comparison of a Microtiter Plate ELISA with a standard culture procedure for detection of *Salmonella spp.* in chicken. *J.Food Prot.* **59**, 238-243.
- YUASA Y., YOSHIIE K., TAKASAKI T., YOSHIDA H. & ODA H. (1996) Retrospective survey of chronic Q fever in Japan by using PCR to detect *Coxiella burnetii* DNA in paraffin-embedded clinical samples. *J Clin Microbiol* **34**, 824-827.
- ZHANG G.Q., TO H., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1997) Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol Immunol* **41**, 871-877.
- ZHANG G.Q., HOTTA A., MIZUTANI M., HO T., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1998) Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. *J Clin Microbiol* **36**, 2210-2213.

ZHANG G.Q., NGUYEN S.V., TO H., OGAWA M., HOTTA A., YAMAGUCHI T., KIM H.J., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1998) Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *J Clin Microbiol* **36**, 77-80.

7 ANHANG

1x PBS Puffer (Waschpuffer zur Probenaufarbeitung)

150 mM Natriumchlorid
10 mM Natriumphosphat
0,05 % Tween[®] 20
pH 7,5

1x TE Puffer

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

1x TBE Puffer (Tris Borat EDTA Puffer)

90 mM Tris-Borat
2 mM EDTA
pH 8,3

Ladepuffer für Agarosegele

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol FF
30,0 % Glycerin

Puffer für den Nachweis von PCR-Amplifikaten in Mikrotiterplatten

Bindungspuffer zu Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Fangsonde

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
100 mM NaCl
0,15 % Triton-X-100
pH 7,5

Denaturierungspuffer

125 mM NaOH
20 mM EDTA

Hybridisierungspuffer

2,5 x SSC
2 x Denhardt's Lösung
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 7,5

10x Denhardt's Lösung

2,0 g/l Ficoll® Typ 400
2,0 g/l Polyvinylpyrrolidon
2,0 g/l BSA (Fraktion V)

20x SSC

175,3 g/l Natriumchlorid
88,2 g/l Natriumcitrat
pH 7,4

Waschpuffer I

1 x SSC
2 x Denhardt's
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 7,5

Waschpuffer II

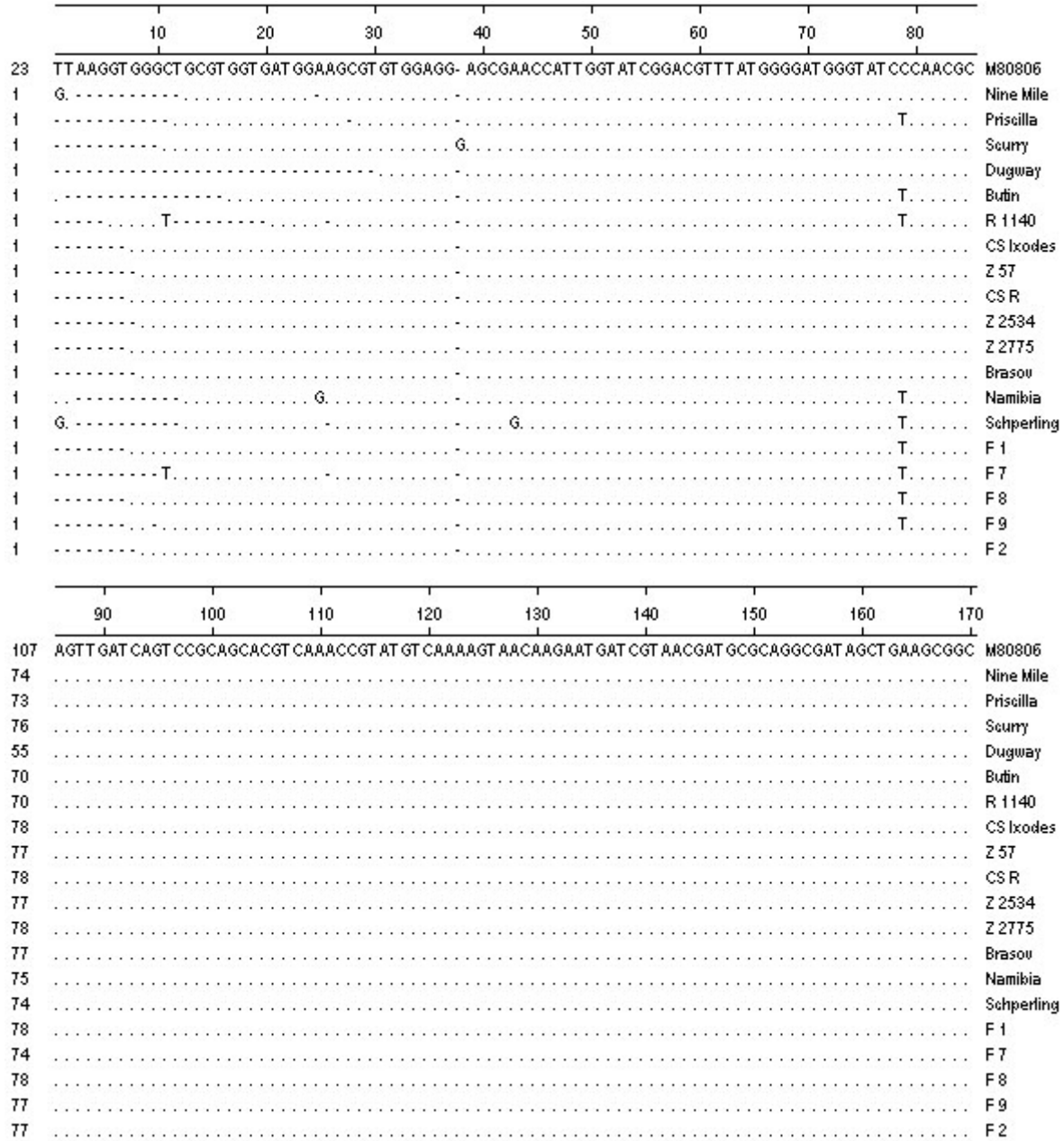
100 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,05 % Tween® 20
0,5 % Blocking Reagenz
100 µg/ml Heringsperma-DNA
pH 7,5

Stopp-Reagenz

0,5 M H₂SO₄

Abb. 7-1: DNA-Sequenzvergleich der *Coxiella burnetii* Amplifikate

(Sequenzausschnitt aus Acession-Nr.: M80806 nach Hoover *et al.*, 1992)



	180	190	200	210	220	230	240	250										
192	TT	CCC	GCG	CCT	CGAT	GCG	GTTT	GT	GCAGGGT	AAAACGGT	GGAACAACAAGACGTT	CAAGCGCT	GTT	AAAGAT	ACGCGAT	CGTTT	A	M80806
159																	Nine Mile
158																	Priscilla
161																	Scurry
140																	Dugway
155																	Butin
155																	R 1140
163																	CS Ixodes
162																	Z 57
163																	CS R
162																	Z 2534
163																	Z 2775
162																	Brasov
160																	Namibia
159																	Schperling
163																	F 1
159																	F 7
163																	F 8
162																	F 9
162																	F 2

	260	270	280	290	300	310	320	330	340									
277	GT	CAAAAGCCGCA	CGGCGCT	GAT	CAAT	GAGATT	CGGGGTT	GTT	GCAAGAAT	ACGGACT	CACGAT	GGCGCGT	GGT	GCCAAGCGAT			M80806	
244																	Nine Mile
243																	Priscilla
246																	Scurry
225																	Dugway
240																	Butin
240																	R 1140
248																	CS Ixodes
247																	Z 57
248																	CS R
247																	Z 2534
248																	Z 2775
247																	Brasov
245																	Namibia
244																	Schperling
248																	F 1
244																	F 7
248																	F 8
247																	F 9
247																	F 2

	350	360	370	380	390	400	410	420	
362	TTT AT GAAGAGCT CCCGTT GATTTT AGCGAGCGAAGCGGT GGGATT AACACCGCGGAT GAAACGGGT GTT GAATT GTTT GT AT AC								M80806
329 - - C								Nine Mile
328								Priscilla
331								Scury
310								Dugway
325								Butin
325								R 1140
333								CS Ixodes
332								Z 57
333								CS R
332								Z 2534
333								Z 2775
332								Brasov
330 GC								Namibia
329								Schperling
333								F 1
329								F 7
333								F 8
332 C								F 9
332								F 2

	430	440	450	460	470	480	490	500	510	
447	CGAATT GTT GAACCGGGACGAAGCGATT GGT GATT ACGAGGAGGAATT AAAAGCGGT GGCAAAAGCCAAT GAGGATT GT CAACGG									M80806
412									Nine Mile
413									Priscilla
416 C									Scury
395									Dugway
410									Butin
410									R 1140
418									CS Ixodes
417									Z 57
418									CS R
417									Z 2534
418									Z 2775
417									Brasov
413									Namibia
414									Schperling
418									F 1
414 C C									F 7
418									F 8
417									F 9
416									F 2

	520	530	540	550	560	570	580	590	
532	GT ACAGAGCAT CCCGGGGGT GGGTT ATTT AACGGCGCT CT CGGTTT AT GCGAGCGT GGGT GACATT CAT CAATTT CAT CGTT CCC								M80806
497								Nine Mile
498			G.					Priscilla
501			G.		G.			Scurry
480								Dugway
495			G.					Butin
495			G.					R 1140
503								CS Ixodes
502								Z 57
503								CS R
502								Z 2534
503								Z 2775
502								Brasov
498			G.					Namibia
499			G.					Schperling
503	T.		G.					F 1
499			G.					F 7
503			G.					F 8
502			G.					F 9
501			G.					F 2

	600	610	620	630	640	650	660	
617	GGCAGTT GT CGGC GTT ATT GGGTT GGT CCCT CGACAACATT CGAGT GGGAAAT AAGGAGGT GTT GTT GGG							M80806
582							Nine Mile
583		T. C-----	C-----	A. G. . GA. -----		N	Priscilla
586							Scurry
565					T.G.		Dugway
580							Butin
579							R 1140
588							CS Ixodes
587							Z 57
588							CS R
587				T. T. T.			Z 2534
588							Z 2775
587							Brasov
583							Namibia
584	C.			A. A. A.			Schperling
588							F 1
584				N. N. N.			F 7
588							F 8
587						GT	F 9
586							F 2

Abb. 7-2: DNA-Sequenzvergleich der *Francisella* Amplifikate

(Sequenzausschnitt aus Acession-Nr.: M32059 nach Sjostedt *et al.*, 1990)

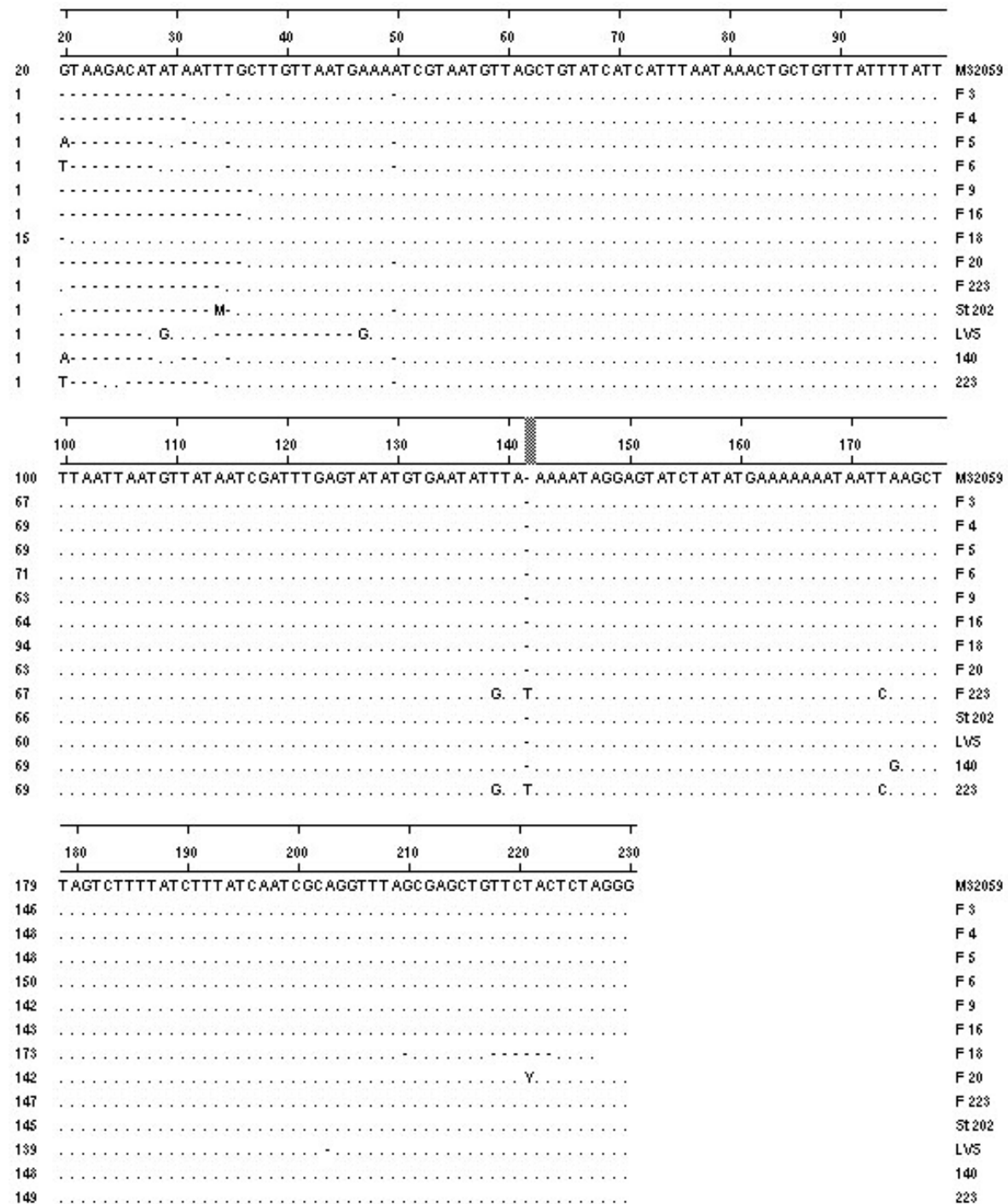
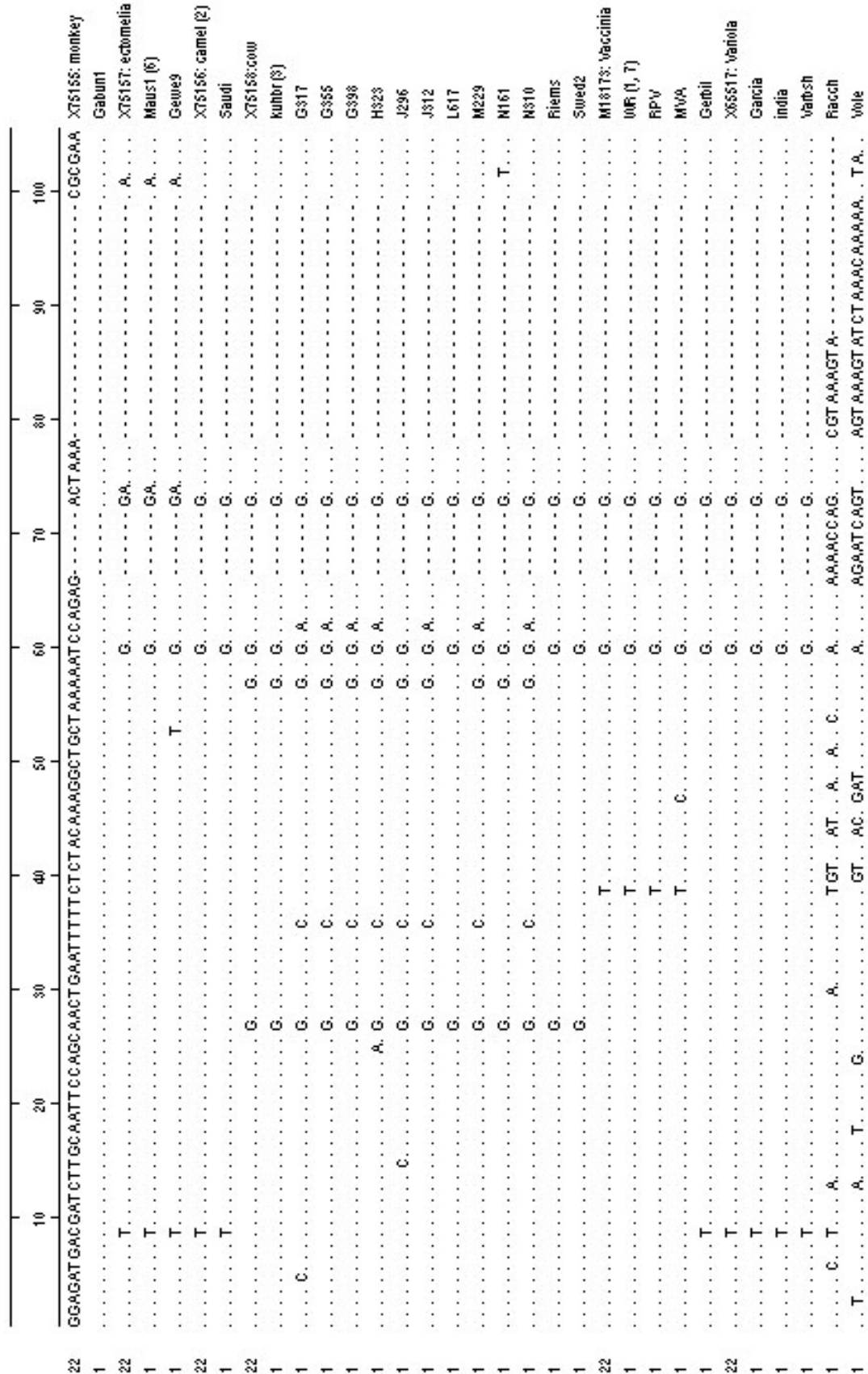


Abb. 7-3: DNA-Sequenzvergleich der Orthopockenviren Amplifikate

(Sequenzausschnitt aus Acession-Nr.: X75155 - X75158 nach Meyer *et al.*, 1994; M18173 nach Rodriguez *et al.*, 1987; X65517 nach Engelstad *et al.*, 1993)



	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	
100	GCAATTGTTAAGCCTATGGAGA				CCGATAATGA			GGAACTCTCAAACACCGACTA	AACTAATTTGGAA			X75155: monkey Gabuni
79					C				G			
100		C										X75157: ectomelia
79		C								G		Maus1 (6)
79		C								G		Geue9
100		A								C		X75156: camel (2)
79		A								G		Saudi
100		TG.G			T.C				A			X75158: cow
79		TG.G			T.C				A			kunbr (8)
79		TG.G			T.C				A			G317
79		TG.G			T.C				A			G355
79		TG.G			T.C				A			G396
79		TG.G			T.C				A			H323
79		TG.G			T.C				A			J296
79		TG.G			T.C				A			J312
79		TG.G			T.C				A			L617
79		TG.G			T.C				A			M229
79		TG.G			T.C				A			M161
79		TG.G			T.C				A			N310
79		TG.G			T.C				A			Riems
79		TG.G			T.C				A			Sued2
100		G			C					G		M18173: vaccinia
79		G			C					G		100r (1, 7)
79		G			C					G		RPV
79		G			C					G		MVA
79		G			C					G		Gebil
100		G			T					G		X55517: variola
79		G								G		Garcia
79		G								G		India
79		G			A					G		Vandsh
88									GA.A	GCC.A		Racch
106		AG			GGATGATCCAGATGAGATGA					G.T		Vole

166	AAAAAGATT ACT AAT AT AAC AAC AAAGTTT GAACAAAT AGAAAAGT GTT GT AACGCAACGAT GAAGTT CT ATTT AGGTT GGAAAAT CACGGTGA AACT CT AACA	XT5156: monkey
145	Gabunt
166 G.....	XT5157: ectomelia
145 G..... C.....	Maus1 (6)
145 G..... C.....	Genue9
166 A..... G..... C.....	XT5156: camel (2)
145 A..... G..... C.....	Saudi
166 G..... G..... C.....	XT5156: cow
145 G..... G..... C.....	Kuhbr (8)
145 G..... G.....	G317
145 A..... G.....	G355
145 G..... G..... C.....	G398
145 G..... G.....	H323
145 G..... G.....	J296
145 G..... G.....	J312
145 A..... G.....	L617
145 C..... G..... T.....	M229
145 G..... G..... T.....	M161
145 G..... G.....	N310
145 G..... G..... A.....	Riems
145 A..... G..... C.....	Sued2
166 G..... G.....	M18173: vaccinia
145 G..... G.....	00R (1, T)
145 G..... G.....	RPV
145 G..... G.....	MVA
145 A..... G..... T.....	Gerbil
166 A..... G..... G..... T..... C.....	X65517: Variola
145 A..... G..... G..... C.....	Garcia
145 A..... G..... T..... C.....	India
145 A..... G..... T..... C.....	Varfsh
172 A..... A..... G..... A..... C..... C..... T..... T..... GT..... C..... AC..... T..... C..... A.....	Racch
211 G..... G..... A..... C..... C..... G..... A..... C..... C..... T..... T..... G..... C..... AC.....	Wole

Danke!

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Böhm für seine vielfältigen Anregungen und die stets gewährte freundliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Müller (Berlin) danke ich sehr für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Amselgruber und Prof. Dr. W. Drochner bedanke ich mich für die Mitwirkung als Prüfer sowie für die angenehme Prüfungsatmosphäre.

Der Geschäftsleitung der Biotecon bzw. BIOTECON Diagnostics GmbH, Frau Dr. Kornelia Berghof, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter dem Dach dieser Firmen durchführen zu können. Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in den Laboren beider Firmen durchgeführt.

Bei meinem „abschnittsweisen Betreuer“ Dr. Freimut Wilborn bedanke ich mich für die Betreuung sowie die Korrektur des ersten Entwurfes und für allerlei nützliche Tipps. Dem Computerspezialisten Dipl.-Ing. Douglas Friday danke ich für die Unterstützung in technischen Fragen sowie für die Korrektur des englischsprachigen Manuskriptes. Silke Ihle danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch allen anderen derzeitigen und ehemaligen Firmenangehörigen, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dank der finanziellen Förderung durch das Bundesamt für Wehrtechnik und Beschaffung (Referat BA IV 2) war dieses Projekt erst möglich.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere aber Andreas, der mich von Anfang an bei „diesem Projekt“ unterstützt hat. Ohne den in ihm gefundenen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Simone Kohlhaußen, geb. Wiegand
geboren am 15.11.1968 in Braunschweig
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1975 - 1979 Grundschule Meine
1979 - 1981 Orientierungsstufe Meine
1981 - 1988 Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn

Berufsausbildung

1988 - 1990 Klaus Steilmann GmbH Braunschweig
Ausbildung zur Bekleidungsfertigerin
1990 - 1991 Anstellung als Bekleidungsfertigerin

Studium

1991 - 1994 Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
Grundstudium Fachrichtung Biotechnologie
1994 – 1998 Hauptstudium Fachrichtung Biotechnologie
02 - 09/1995 GBF Braunschweig, Abteilung Mikrobiologie
Anstellung als studentische Hilfskraft
Sekundärstoffscreening
01 – 05/1996 Amino GmbH Frellstedt
Studienarbeit: Charakterisierung und Optimierung eines
technischen Verfahrens zur Trennung von Aminosäuren und
Sacchariden aus Naturstoffgemischen
04 – 11/1997 Bayer AG Leverkusen, Bereich Zentrale Forschung
Biotechnologie
Diplomarbeit: Isolierung und taxonomische Charakterisierung
von Mikroorganismen, die Polyesteramide abbauen können
01/1998 Studienabschluß Diplom-Biotechnologin

Beruf

08/1998 - 03/2000 BioteCon GmbH Potsdam
Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin)
Betriebsübergang
seit 04/2000 BIOTECON Diagnostigs GmbH Potsdam
Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin)