

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Angefertigt am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
(OTV Prof. Dr. med. vet. Hermann Meyer)

**Generierung und genotypische Untersuchung eines
Ciprofloxacin-resistenten *Bacillus cereus* Stammes
und
Entwicklung von real-time-PCR-Schnelltests zum
Nachweis von Resistenzen gegen Ciprofloxacin in
*Bacillus anthracis***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Anika Hübner

aus Jena

München, 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meinen Mentoren

Barbara und Detlev

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	VII
1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Bacillus anthracis</i>	2
1.1.1	Allgemeines zum Erreger	2
1.1.2	Taxonomie	2
1.1.3	Sporenbildung	2
1.1.4	Pathogenitätsfaktoren	3
1.1.5	Diagnostik	4
1.2	Krankheit Milzbrand	7
1.2.1	Krankheitsbild Tier	7
1.2.2	Krankheitsbild Mensch	7
1.2.3	Therapie und postexponentielle Prophylaxe Tier	9
1.2.4	Therapie und postexponentielle Prophylaxe Mensch.....	10
1.3	Epidemiologie	11
1.4	<i>B. anthracis</i> als biologisches Agens.....	12
1.5	Antibiotika-Resistenzen.....	13
1.5.1	Fluorochinolon-Resistenz.....	14
1.6	Ziele der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Organismen und Templates	18
2.1.1	Organismen	18
2.1.2	Synthetische Templates	20
2.2	Zellanzucht.....	22
2.2.1	Nährmedium: Mueller-Hinton-II-Agar	22
2.2.2	Antibiotika: Chinolone (= Gyrasehemmer)	22
2.2.2.1	Ciprofloxacin	23
2.2.2.2	Nalidixinsäure	23
2.2.3	Herstellung der antibiotikahaltigen Agar-Platten	23

I Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Inkubationsbedingungen	24
2.2.5	Selektion der Ciprofloxacin-resistenten Mutanten	24
2.2.6	Selektion der Nalidixinsäure-resistenten Mutanten	25
2.2.7	Überprüfung der minimalen Hemmstoffkonzentration	26
2.2.7.1	Gradientendiffusionstest	26
2.2.7.2	Mikrodilutionstest	27
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1	DNA-Extraktion	30
2.3.2	Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion.....	30
2.3.2.1	Primer	30
2.3.2.2	Lösungen und PCR-Ansatz.....	31
2.3.2.3	Thermoprofil.....	31
2.3.2.4	Gelelektrophorese.....	32
2.3.3	Sequenzierung.....	33
2.3.3.1	Aufreinigung PCR-Produkte.....	33
2.3.3.2	<i>In-House</i> -Sequencing	33
2.3.3.2.1	Farbmarkierung.....	34
2.3.3.2.2	Aufreinigung Farbmarkierungs-Produkte	34
2.3.3.2.3	Sequenzierung.....	35
2.3.3.3	Sequenzierung durch kommerziellen Anbieter.....	35
2.3.3.4	Auswertung der Daten	35
2.3.4	Real-Time-PCR.....	35
2.3.4.1	TaqMan.....	35
2.3.4.1.1	Proben	36
2.3.4.1.2	Primer und Sonden	36
2.3.4.1.3	Lösungen und PCR-Ansatz.....	38
2.3.4.1.4	Thermoprofil.....	39
2.3.4.1.5	Auswertung	40
2.3.4.2	Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (= MeltMAMA; nach Birdsell et al., 2012 (42)).....	40
2.3.4.2.1	Proben	41
2.3.4.2.2	Primer	41

I Inhaltsverzeichnis

2.3.4.2.3	Lösungen und PCR-Ansatz.....	42
2.3.4.2.4	Thermoprofil.....	42
2.3.4.2.5	Auswertung	43
2.3.5	Quantitative Real-Time-PCR.....	43
2.3.5.1	<i>B. anthracis gyrA</i> Plasmid PCR	43
2.3.5.1.1	Proben	43
2.3.5.1.2	Primer und Sonde	43
2.3.5.1.3	Lösungen und PCR-Ansatz.....	44
2.3.5.1.4	Thermoprofil.....	44
2.3.5.1.5	Auswertung	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Ciprofloxacin-resistente <i>B. cereus</i> Mutanten	46
3.1.1	Generierung der Mutanten	46
3.1.2	Sequenzierung.....	49
3.2	Nalidixinsäure-resistente <i>B. cereus</i> Mutanten	50
3.2.1	Generierung der Mutanten	50
3.2.2	Sequenzierung.....	51
3.3	Kreuzresistenz der <i>B. cereus</i> Mutanten	52
3.4	MHK-Wert Bestimmung verschiedener <i>B. cereus</i> Stämme.....	53
3.5	MeltMAMA Assay	54
3.5.1	Protokoll: MM_gyrA254.....	55
3.5.2	Sensitivität und Spezifität	56
3.6	TaqMan Assays.....	61
3.6.1	Protokoll: TM_gyrA254.....	62
3.6.2	Protokoll: TM_gyrA265.....	65
3.6.3	Protokoll: TM_gyrA266.....	68
3.6.4	Protokoll: TM_gyrB1408.....	70
3.6.5	Protokoll: TM_gyrB1423.....	72
3.6.6	Protokoll: TM_parC242	73
3.6.7	Protokoll: TM_parC244	76

I Inhaltsverzeichnis

3.6.8	Protokoll: TM_parC253	77
3.6.9	Sensitivität und Spezifität	79
4	Diskussion	89
4.1	Generierung resistenter <i>B. cereus</i> Mutanten	89
4.1.1	Resistenz gegen Ciprofloxacin.....	91
4.1.2	Resistenz gegen Nalidixinsäure	95
4.1.3	Kreuzresistenz	97
4.2	MHK-Wert-Bestimmung verschiedener <i>B. cereus</i> Stämme.....	99
4.3	synthetische Oligonukleotide	100
4.4	Entwicklung Schnelltests.....	101
4.4.1	MeltMAMA	102
4.4.2	TaqMan.....	106
4.4.2.1	Auswertung	107
4.4.2.2	Sensitivität und Spezifität	108
4.5	Einsatz des Schnelltests in der Diagnostik	110
II	ZUSAMMENFASSUNG.....	112
III	SUMMARY	114
IV	LITERATURVERZEICHNIS.....	116
V	DANKSAGUNG	124

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIP	Ciprofloxacin
CIP-MHII-Agar	ciprofloxacinhaltiger Mueller-Hinton-II-Agar
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Ct	cycle threshold
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ödemfaktor
ET	Ödemtoxin
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
G	Guanin
h	Stunden
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
LF	Letalfaktor
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LT	Letaltoxin

Abkürzungsverzeichnis

M	Mutation
MeltMAMA	Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays
µg	Mikrogramm
MHK	minimale Hemmstoffkonzentration
MHII-Agar	Mueller-Hinton-II-Agar
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
pmol	Picomol
NAL	Nalidixinsäure
PA	protektives Antigen
PBS-Lösung	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
QRDR	Quinolone resistance determining regions
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
s	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphisms
SYBR-Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
V	Volt
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	In der Literatur beschriebene CIP-Resistenz verursachende SNPs bei <i>B. anthracis</i>	16
Tab. 2:	In dieser Arbeit verwendete <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> und andere <i>Bacillus</i> spp. Stämme	18
Tab. 3:	In dieser Arbeit verwendete synthetische Templates	21
Tab. 4:	Zusammensetzung Mueller-Hinton-II-Agar nach Angaben des Herstellers	22
Tab. 5:	Liste der für die konventionelle PCR benutzten Primer	31
Tab. 6:	PCR-Ansatz der vier konventionellen PCR	31
Tab. 7:	verwendetes Thermoprofil für die vier konventionellen PCRs	32
Tab. 8:	Zusammensetzung Gebrauchslösung 50 x TAE-Puffer	32
Tab. 9:	Probenansatz für Farbmarkierung	34
Tab. 10:	Thermoprofil der Farbmarkierung	34
Tab. 11:	für TaqMan-PCR verwendete Primer	37
Tab. 12:	für TaqMan-PCR verwendete Sonden	38
Tab. 13:	allgemeiner PCR-Ansatz TaqMan	39
Tab. 14:	Thermoprofil für jeden singleplex TaqMan PCR-Ansatz	39
Tab. 15:	Für MeltMAMA-PCR verwendete Primer	41
Tab. 16:	PCR-Ansatz für MeltMAMA-PCR	42
Tab. 17:	Thermoprofil für MeltMAMA <i>gyrA</i> SNP254 C>T	42
Tab. 18:	Primer und Sonde für <i>B. anthracis gyrA</i> PCR	44
Tab. 19:	PCR-Ansatz für die <i>B. anthracis gyrA</i> Plasmid PCR	44
Tab. 20:	Thermoprofil für <i>B. anthracis gyrA</i> Plasmid PCR	44
Tab. 21:	Auflistung generierter Reihen an <i>B. cereus</i> CIP-Mutanten und MHK-Werte	48
Tab. 22:	Liste generierter <i>B. cereus</i> NAL-Mutanten und zugehöriger MHK-Werte	51
Tab. 23:	Liste <i>B. cereus</i> Mutanten und zugehöriger CIP- sowie NAL-MHK-Werte laut Gradientendiffusionstest	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 24: Schmelztemperaturen Negativ- und Mutationskontrolle	56
Tab. 25: Schmelztemperaturen der Wildtypkontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.4 in Verdünnungsreihe	59
Tab. 26: Schmelztemperaturen der Mutationskontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.3 in Verdünnungsreihe	60
Tab. 27: Liste der TaqMan-Protokolle und der zugehörigen SNPs	61
Tab. 28: Sondenverhältnis der TaqMan PCR-Ansätze	61
Tab. 29: Auswertung TM_gyrA254 über Ct-Werte	65
Tab. 30: Auswertung TM_gyrA265 über Ct-Werte	67
Tab. 31: Auswertung TM_gyrA266 über Ct-Werte	69
Tab. 32: Auswertung TM_gyrB1408 über Ct-Werte	71
Tab. 33: Auswertung TM_gyrB1423 über Ct-Werte	73
Tab. 34: Auswertung TM_parC242 über Ct-Werte	75
Tab. 35: Auswertung TM_parC244 über Ct-Werte	77
Tab. 36: Auswertung TM_parC253 über Ct-Werte	79
Tab. 37: Ct-Werte HEX TM_gyrA265 der Wildtypkontrolle <i>B. anthracis</i> 3390 mit Verdünnungsreihe	82
Tab. 38: Ct-Werte FAM-Signal TM_gyrB1408 der Mutationskontrolle Po mit Verdünnungsreihe	84
Tab. 39: Ct-Werte HEX-Signal der verschiedenen <i>Bacillus</i> spp. für jedes TaqMan-Protokoll	85
Tab. 40: Ct-Werte FAM TM_gyrA254 Kontrollproben verschiedener <i>Bacillus</i> spp	86
Tab. 41: Ct-Werte FAM TM_gyrA266 Kontrollproben verschiedener <i>Bacillus</i> spp	88
Tab. 42: Vergleich SNP-Vorkommen in verschiedenen Studien und Faktor der Erhöhung des WT-MHK-Wertes bei erster Entstehung SNP	93
Tab. 43: Vergleich MHK-Werte verschiedener Fluorochinolone eines gegen CIP resistent generierten <i>B. anthracis</i> Stammes nach <i>Grohs et al. (2004)</i>	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erscheinungsbild Injektionsmilzbrand eines erkrankten Heroinkonsumenten nach Injektion der Droge in den Unterarm	1
Abb. 2: Real-time-PCR auf den Marker dhp61	6
Abb. 3: Bergung einer an Milzbrand verstorbenen und in der Elbe abgetriebenen Mutterkuh der im Juli 2012 betroffenen Rinderherde in Sachsen-Anhalt	11
Abb. 4: Schema der Vorgehensweise zur Selektion CIP-resistenter <i>B. cereus</i> Mutanten	25
Abb. 5: quantitative Auswertung eines Gradientendiffusionstests	27
Abb. 6: Auswertung eines Mikrodilutionstests	29
Abb. 7: <i>B. cereus</i> ATCC10987 Wildtyp mit MHK-Wert 0,125 µg/ml CIP, Gradientendiffusionstest	46
Abb. 8: Mikrodilutionstest von <i>B. cereus</i> ATCC10987 Wildtyp	47
Abb. 9: Gradientendiffusionstests während Generierung der <i>B. cereus</i> CIP-Mutante 1.3	49
Abb. 10: Ausschnitt Gen <i>gyrA</i> des <i>B. cereus</i> Wildtyps und der Mutante 1.3	50
Abb. 11: Ausschnitt Gen <i>gyrB</i> des <i>B. cereus</i> Wildtyps und der Mutante 1.2 N	52
Abb. 12: Darstellung der MHK-Werte für CIP der 93 untersuchten <i>B. cereus</i> Stämme	54
Abb. 13: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 mit Negativ- und Mutationskontrolle	56
Abb. 14: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 der Wildtypkontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.4 mit Verdünnungsreihe	58
Abb. 15: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 der Mutationskontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.3 mit Verdünnungsreihe	60
Abb. 16: Amplifikationskurven TM_gyrA254 HEX-Signal	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 17: Amplifikationskurven TM_gyrA254 FAM-Signal	64
Abb. 18: Amplifikationskurven TM_gyrA265 HEX-Signal	66
Abb. 19: Amplifikationskurven TM_gyrA265 FAM-Signal	67
Abb. 20: Amplifikationskurven TM_gyrA266 HEX-Signal	68
Abb. 21: Amplifikationskurven TM_gyrA266 FAM-Signal	69
Abb. 22: Amplifikationskurven TM_gyrB1408 HEX-Signal	70
Abb. 23: Amplifikationskurven TM_gyrB1408 FAM-Signal	71
Abb. 24: Amplifikationskurven TM_gyrB1423 HEX-Signal	72
Abb. 25: Amplifikationskurven TM_gyrB1423 FAM-Signal	73
Abb. 26: Amplifikationskurven TM_parC242 HEX-Signal	74
Abb. 27: Amplifikationskurven TM_parC242 FAM-Signal	75
Abb. 28: Amplifikationskurven TM_parC244 HEX-Signal	76
Abb. 29: Amplifikationskurven TM_parC244 FAM-Signal	77
Abb. 30: Amplifikationskurven TM_parC253 HEX-Signal	78
Abb. 31: Amplifikationskurven TM_parC253 FAM-Signal	79
Abb. 32: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA265 der Wildtypkontrolle <i>B. anthracis</i> 3390 mit Verdünnungsreihe	81
Abb. 33: Amplifikationskurven FAM-Signal TM_gyrB1408 der Mutationskontrolle Po mit Verdünnungsreihe	83
Abb. 34: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA254 Kontrollproben verschiedener <i>Bacillus</i> spp.	86
Abb. 35: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA266 Kontrollproben verschiedener <i>Bacillus</i> spp.	87
Abb. 36: Phylogenetischer Baum einiger Vertreter der <i>B. cereus</i> sensu lato Gruppe	90
Abb. 37: Schematische Darstellung des <i>B. anthracis</i> Genoms rund um das Gen GBAA0834	95
Abb. 38: Vorgehensweise während Entwicklung eines MeltMAMA-Assays	103
Abb. 39: Auswertung Schnelltest von <i>Lapierre et al.</i> (2003)	108

1 Einleitung

1 Einleitung

Bacillus (B.) anthracis, der Erreger von Milzbrand, steht immer wieder in den Schlagzeilen:

Für großen Pressewirbel sorgten im Jahr 2001 die mit Milzbrandsporen gefüllten Briefe in den USA, welche bei 22 Menschen nach Kontakt mit den Briefen zu Infektionen und bei fünf dieser Infizierten zum Tode führten (1, 2). Die Briefe lösten nicht nur eine der aufwändigsten Kriminaluntersuchungen, namens „Amerithrax“, aus, sondern begründeten auch die Geburtsstunde der Bioforensik.

Zuletzt in die Schlagzeilen gelangte Milzbrand als mit Sporen kontaminiertes Heroin, infolgedessen in den Jahren 2000, 2009, 2010, 2012 und 2013 insgesamt 63 Fälle einer neuen Form des Milzbrandes, dem Injektionsmilzbrand (siehe Abb. 1), auftraten, von denen über 26 zum Tode führten (3-6).



Abb. 1: Erscheinungsbild Injektionsmilzbrand eines erkrankten Heroinkonsumenten nach Injektion der Droge in den Unterarm
(Quelle: <http://www.bmj.com/content/340/bmj.c889/F1.large.jpg>)

1 Einleitung

1.1 *Bacillus anthracis*

1.1.1 Allgemeines zum Erreger

Die Krankheit Milzbrand wird durch das grampositive Bakterium *B. anthracis* ausgelöst (7). *B. anthracis* ist ein endosporenbildendes, aerobes beziehungsweise fakultativ anaerobes, unbewegliches, 0,5 – 2,5 x 1,2 – 10 µm großes Stäbchenbakterium, dessen ellipsoide Sporen sich zentral in der Zelle entwickeln, ohne diese aufzutreiben (8).

1.1.2 Taxonomie

B. anthracis ist ein Teil der *Bacillus cereus* sensu lato Gruppe. Diese setzt sich aus *B. cereus* sensu stricto, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* und einigen weiteren, wenig untersuchten Arten zusammen (19). Besonders *B. cereus* und *B. anthracis* sind als humanpathogene Spezies bekannt. Die restlichen Vertreter der *B. cereus* sensu lato Gruppe können jedoch auch humanpathogene Eigenschaften aufweisen. Die fünf Spezies sind geno- und phänotypisch sehr nah miteinander verwandt (19). Dies zeigt sich unter anderem durch eine sehr ähnliche Zusammensetzung des Genoms sowie nahezu identische 16S rDNA Gene. Die unterschiedliche Pathogenität der Spezies ist darin begründet, dass die jeweiligen Pathogenitätsfaktoren zumeist durch Plasmide kodiert werden. In der Diagnostik ist eine Unterscheidung zwischen diesen nah verwandten Bakterienspezies schwierig, aber aufgrund der höheren Pathogenität von *B. cereus* und *B. anthracis* notwendig.

1.1.3 Sporenbildung

Die Sporenbildung ist abhängig von vielen Faktoren. Dazu zählen der Luftsauerstoffgehalt, die Umgebungstemperatur, der Nährstoffgehalt, der

1 Einleitung

pH-Wert und der Ionengehalt des umgebenden Materials. Nur bei vorhandenem Sauerstoff kommt es zur Bildung der Sporen. Zusätzlich wirkt eine hohe Umgebungstemperatur begünstigend (9). Im geschlossenen Kadaver, unter Sauerstoffausschluss, entstehen keine Sporen. Durch Aasfresser oder eine Schlachtung hingegen gelangt Sauerstoff in die Tierkörper und somit auch an die vegetativen Zellen des Erregers, sodass eine Sporenbildung möglich wird. Die Sporen besitzen eine sehr hohe Tenazität, wodurch sie jahrzehntlang im Boden überleben können (10). So können diese auch bei ungünstigen Umweltbedingungen, wie Hitze und Trockenheit, lange überleben. Auch viele Desinfektionsmittel, wie Alkohole, Jodverbindungen und Chlor, sind unwirksam gegen *Bacillus*-Endosporen.

1.1.4 Pathogenitätsfaktoren

Für die Entstehung des Krankheitsbildes Milzbrand sind mindestens zwei Pathogenitätsfaktoren notwendig (1, 8, 9, 11). Dies ist zum einen die Fähigkeit zur Kapselbildung, welche durch ein Plasmid namens pXO2 kodiert wird. Diese Kapsel besteht aus Poly- γ -D-Glutaminsäure und wird spezifisch nach Infektion im Wirt ausgebildet. Sie verhindert die Phagozytose des Erregers durch Immunzellen (9). Zum anderen ist auf dem Plasmid pXO1 ein 3-Komponenten-Exotoxin kodiert. Dieses besteht aus dem protektiven Antigen (= PA), dem Ödemfaktor (= EF) und dem Letalfaktor (= LF) (9). Das protektive Antigen hat die Möglichkeit sich mit einem der beiden Faktoren zu einem Komplex zu verbinden. Diese Komplexe werden je nach genutztem Faktor als Letaltoxine (= LT) oder Ödemtoxine (= ET) bezeichnet. Das PA wird vom Erreger sezerniert und vermittelt die Endozytose von Ödem- oder Letalfaktor in die Wirtszelle. Dies geschieht durch die Bindung des PA an den zellulären Anthrax Toxin Receptor (1). Infolge dieser Bindung entsteht durch proteolytisches Prozessieren aus dem PA ein Peptid, welches eine Ringstruktur bildet. Das multimerisierte Peptid bindet anschließend einen der beiden sezernierten Faktoren. Dieser gebildete Komplex, bestehend aus Peptid und dem EF

1 Einleitung

beziehungsweise LF, wird durch Endocytose in die Wirtszelle aufgenommen. Nach einer Ansäuerung des Milieus im membranumschlossenen Endosom erfolgt der Einbau der Ringstruktur in die Vesikelmembran, sodass eine Membranpore entsteht. Durch diese wird anschließend der aktive Teil des Toxins, LF beziehungsweise EF, in das Wirtszellzytoplasma entlassen. Dort entfaltet der eingeschleuste Faktor seine Wirkung. Der EF ist eine Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase, durch welche eine starke Erhöhung des intrazellulären cAMP erfolgt (1). Diese Erhöhung bedingt den verstärkten Einbau von Chloridkanälen in die Zellmembran, sodass vermehrt Chlorid-Ionen aus der Zelle ausströmen. Es folgt ein passiver Strom von Natrium-Ionen und Wasser in das umgebende Interstitium. Beim LF handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease (1). Diese behindert die Proteinbiosynthese der Zelle aufgrund einer proteolytischen Wirkung auf mitogenabhängige Proteinkinase-Kinasen was in der Folge zum Zelltod führt, sowie zu einer Freisetzung von Interleukin 1β und dem Tumornekrosefaktor α . Die Bildung der Kapsel und des 3-Komponenten-Toxins erfolgt kurze Zeit nach der Auskeimung der Endospore im Wirt (1). Inwieweit weitere Exoenzyme vom Erreger für die Invasion und Vermehrung benötigt werden, ist unklar (8).

1.1.5 Diagnostik

Grundlegend für eine sichere Diagnose ist eine geeignete Probennahme. Mögliche Probenmaterialien sind Hautabstriche von Läsionen beim Hautmilzbrand, Sputum beim Lungenmilzbrand, Stuhl beim Darmmilzbrand, Blut und Serum bei einer Sepsis und Liquor bei einer Meningitis (11). Bei einer Sektion stellen auch Herzblut, Milz und Lunge mögliche Probenmaterialien dar. Zu den Nachweismethoden eignen sich der mikroskopische, der kulturelle, der Antigen- und der Nukleinsäurenachweis. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Ausstrich- oder Abklatschpräparaten auf Objektträgern können grampositive, gerade und sporenbildende Stäbchen nachgewiesen werden (12). Eine Fixierung der

1 Einleitung

Präparate in z. B. 10%-iger Formaldehydlösung ist notwendig, um Sporen abzutöten. Es sind verschiedene Färbungen möglich. Für den Nachweis der vegetativen Zelle eignen sich die Gram-Färbung und die Kapselfärbung nach Foth oder nach M'Fadyean. Zum Sporennachweis hingegen sind die Färbungen mit Malachitgrün-Safranin, Kongorot oder Karbolfuchsin-Methylenblau geeignet (12). Wenn die Probe aus klinischem Material stammt, sollten die Zellen einzeln oder in kurzen Ketten liegen. Bei einer Probe nach der kulturellen Anzucht bilden sich häufig lange Ketten aus. *B. anthracis* ist unbeweglich, im Gegensatz zum nah verwandten *B. cereus* (13).

B. anthracis ist bezüglich seiner kulturellen Anzucht ein anspruchsloses Bakterium. Es wächst problemlos auf vielen verschiedenen Nährmedien. Für die Erstanzucht ist ein Blutagar besonders geeignet, denn auf diesem ist eine Unterscheidung des nicht hämolysierenden *B. anthracis* von nah verwandten hämolysierenden *Bacillus*-Spezies möglich. Die Kolonien von *B. anthracis* sind rau und trocken mit einem Durchmesser von 2 – 5 mm sowie einer grauweißen, nicht pigmentierten mattglänzenden Oberfläche (12). Sie können ein sogenanntes „Medusenhaupt“, bogenartige Ausläufer um die Kolonie, ausbilden. Diese typische Koloniemorphologie ist jedoch nicht als speziesspezifisch anzusehen (11).

Eine biochemische Differenzierung mit dem API® 50 CH von anderen *Bacillus* Spezies ist möglich, jedoch erlaubt diese keine Abgrenzung zu anderen Vertretern der *Bacillus-cereus*-Gruppe. *In vitro* bildet *B. anthracis* unter normalen Bedingungen keine Kapsel aus. Durch die Zugabe von 0,7%-igem Natriumbicarbonat zum Nährmedium und 5 – 20 % Kohlenstoffdioxid kann man die Bildung einer Kapsel anregen (12). Dadurch ändert sich die Koloniemorphologie leicht, sodass statt einer rauen eine mukoide Oberfläche entsteht.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist heute Mittel der Wahl bei der Milzbranddiagnostik (11). Es werden sowohl konventionelle als auch real-time PCR Methoden genutzt. Hierbei existieren verschiedene Protokolle für den Nachweis des *B. anthracis* Chromosoms und der beiden

1 Einleitung

Virulenzplasmide pXO1 und pXO2. Es gibt aber auch Protokolle, durch den Nachweis von single nucleotide polymorphisms (= SNPs) *B. anthracis* diagnostizieren (14). Dies sind Punktmutationen im Genom, welche charakteristisch für bestimmte Bacillenspezies sind.

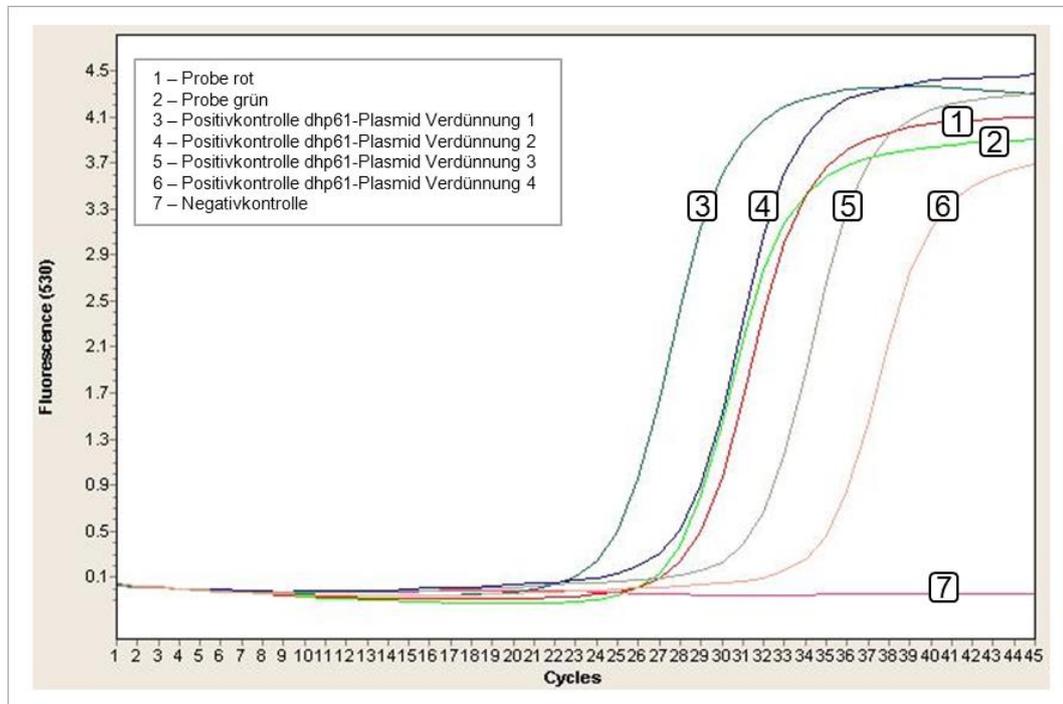


Abb. 2: Real-time-PCR auf den Marker *dhp61*- als Differenzierungsmöglichkeit für *B. anthracis* gegen andere *Bacillus* spp. Die Kurven 1 und 2 zeigen die Amplifikationskurven für zwei Proben. Diese zeigen einen Anstieg der Fluoreszenz und damit die Amplifikation des *B. anthracis* spezifischen, chromosomalen Markers *dhp61*, wodurch sich beide Proben als *B. anthracis* Stämme charakterisieren. Die anderen Kurvenverläufe sind eine Negativ- (7) sowie 4 Verdünnungsstufen der Positivkontrolle (3, 4, 5 und 6).

Die endgültige Diagnose Milzbrand entsteht immer durch eine Kombination der vorher genannten Nachweismethoden, wobei die PCR eine besondere Rolle einnimmt.

1 Einleitung

1.2 Krankheit Milzbrand

1.2.1 Krankheitsbild Tier

Am häufigsten tritt die Krankheit bei Weidetieren, wie Rindern, Schafen und Pferden, auf (7, 8). Diese nehmen die *B. anthracis* Sporen beim Grasen oral auf, wo diese durch Wunden in der Maulschleimhaut in den Blutkreislauf eintreten können. Infizierte Tiere zeigen einen septikämischen perakuten bis akuten Krankheitsverlauf. Sie haben hohes Fieber. Bei betroffenen Pferden treten zusätzlich meist heftige Kolikerscheinungen auf. Durch Gerinnungsstörungen kommt es zum Austritt von dunklem Blut aus sämtlichen Körperöffnungen. Auch Blutungen in Körperhöhlen und Organe treten infolgedessen auf, sowie Blutinfiltrationen in die Unterhaut. In der pathologischen Untersuchung fällt die vergrößerte, hyperämische und dunkel verfärbte Milz auf (8, 12). Die Tiere verenden innerhalb von ein bis zwei Tagen.

1.2.2 Krankheitsbild Mensch

Abhängig vom Infektionsweg manifestiert sich der Milzbrand beim Menschen in vier Krankheitsformen (3).

Die häufigste Form mit 95 % aller Fälle ist der Hautmilzbrand. Die Infektion erfolgt durch den Eintritt des Erregers oder seiner Sporen durch Verletzungen der Haut. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis fünf Tagen treten eine Rötung und ein Ödem der Haut an der Eintrittsstelle auf. Die Rötung entwickelt sich zu einer Papel, diese in ein Vesikel, aus welchem ein Ulkus mit einer zentralen Nekrose entsteht. Das Ulkus ist von einem schwarzen Schorf bedeckt. Dieses Erscheinungsbild wird *Pustula maligna* genannt. Wenn keine Therapie erfolgt, kann die lokale Erkrankung generalisieren, zu einer Sepsis und unter diesen Umständen zu einer Meningitis führen (1, 12, 15).

Der Darmmilzbrand tritt nach dem Verzehr von Fleisch und Innereien von

1 Einleitung

an Milzbrand erkrankten Tieren auf. Die Inkubationszeit dauert ein bis sieben Tage. Danach treten Bauchschmerzen, Anorexie und Fieber auf. Bei einer Infektion des oberen Gastrointestinaltraktes entstehen oropharyngeale Ulzerationen mit einer Schwellung der zervikalen Lymphknoten. Die Infektion des unteren Gastrointestinaltraktes führt zu blutigem Vomit und blutiger Diarrhoe. Sehr häufig entsteht eine Sepsis. Unbehandelt führt der Darmmilzbrand in der Regel zum Tod des Patienten (1, 12, 15).

Nach der inhalierten Aufnahme von Sporen kann es zum Lungenmilzbrand kommen. Aufgrund der geringen Größe der Sporen, welche durchschnittlich 1 µm beträgt, gelangen diese bis in die Alveolen. Lungenmilzbrand tritt natürlicherweise sehr selten auf, ist aber die Manifestation bei einem Einsatz als biologische Waffe. Er endet unbehandelt aber in der Regel tödlich. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis vier Tage. Danach verläuft die Erkrankung meist zweiphasig. In der ersten Phase erscheinen die Symptome eines grippalen Infektes mit Fieber, Müdigkeit und Husten, Muskelschmerzen und andere Allgemeinsymptome. Während der zweiten Phase entsteht eine atypische, hämorrhagische Pneumonie mit Symptomen wie Atemnot, dem Husten von Blut und einem Pleuralerguss. Dieses Krankheitsbild des Milzbrandes führt immer zu einer Sepsis und häufig zu einer Meningitis mit Todesfolge (1, 12, 15).

Der erste bekannte Fall von Injektionsmilzbrand trat im Jahr 2000 in Norwegen auf (4, 5). Er entsteht nach der subkutanen oder intramuskulären Injektion von Sporen des *B. anthracis*. Bisher wurde dieses Krankheitsbild ausschließlich bei Konsumenten von Heroin, welches wahrscheinlich mit Sporen verunreinigt war, beobachtet (16). Nach einer Inkubationszeit von ein – zehn Tagen erscheint die Haut nahe der Injektionsstelle erythematös und ödematös. Auch im umliegenden subkutanen Gewebe sowie in der Muskulatur entstehen Ödeme. Im weiteren Verlauf können sich Abszesse und nekrotisierende Faszitiden in der Haut, dem subkutanem Gewebe und der Muskulatur bilden (siehe Abb. 1). Ein Kompartmentsyndrom entwickelt sich häufig als Folge der Ödematisierung. Es entsteht jedoch keine *Pustula*

1 Einleitung

maligna, wie bei dem Hautmilzbrand beschrieben. Wie auch bei den anderen Milzbrandformen ist eine Komplikation durch die Entstehung einer Sepsis und eine Meningitis möglich. Die Mortalitätsrate des Injektionsmilzbrandes liegt bei ungefähr 30 % (3-5, 17).

Eine Milzbrandsepsis entsteht durch bakteriämische Streuung von *B. anthracis* (15). Diese führt zur Organmanifestation, besonders häufig in den Meningen, der Lunge und der Lymphgefäße. Auf die Entzündung der befallenen Organe folgt multiples Organversagen durch die Aktivität der Exotoxine. Der Patient fällt in einen hypotensiven Schockzustand, welcher selbst trotz intensiver Therapie meist zum Tod führt. Allgemeine Symptome einer Sepsis sind Gerinnungsstörungen, Fieber, Mattigkeit, Kreislaufstörungen und Anorexie. Die spezifischen Symptome entstehen je nach befallenem Organ. Bei einer Meningitis kommt es unter anderem zu Kopfschmerzen, Kreislaufstörungen mit Herzkreislaufversagen und Atemlähmung (1). Die Sepsis und die Meningitis verlaufen ohne eine rasche Therapie des Patienten tödlich (12).

1.2.3 Therapie und postexponentielle Prophylaxe Tier

Aufgrund des zumeist perakuten Verendens erkrankter Weidetiere ist eine Therapie dieser nicht möglich (8).

Bei einer möglichen Exposition von Weidetieren mit dem Erreger kann eine postexponentielle Prophylaxe erfolgen (18). In dem letzten Ausbruch in Deutschland in einer Rinderherde bei Stendal in Sachsen-Anhalt wurde eine solche postexponentielle Prophylaxe durchgeführt (19). Alle Tiere, welche Kontakt zu an Milzbrand erkrankten Tieren hatten, erhielten ein Antibiotikum. Allgemein gilt, dass in diesen Fällen Penicilline oder Gyrasehemmer eingesetzt werden sollten (8). Zusätzlich wurden die Tiere isoliert gehalten und sie unterstanden einer genaueren Beobachtung für ca. drei Wochen. Auch eine Impfung betroffener Tiere kann durchgeführt werden. Jedoch ist momentan in Deutschland kein Impfstoff für Tiere

1 Einleitung

zugelassen (8).

1.2.4 Therapie und postexponentielle Prophylaxe Mensch

Die Therapie erkrankter Menschen besteht vorrangig aus der Gabe von Antibiotika. Als Therapie der Wahl werden Ciprofloxacin und Doxycyclin verwendet (1, 11). Sie werden wie folgt dosiert: Ciprofloxacin 400 mg alle 12 Stunden intravenös oder 500 mg alle 12 Stunden oral, Doxycyclin 200 mg als Initialdosis intravenös und anschließend 100 mg alle 12 Stunden intravenös oder 100 mg alle 12 Stunden oral (11). Bei schweren Fällen erfolgt die Therapie primär intravenös. Sobald der Patient stabil ist, kann die weitere Einnahme der Medikamente jedoch oral weitergeführt werden. Die Therapiedauer beträgt mindestens 60 Tage (11). Beide Antibiotika sollten vor der Gabe durch einen Resistenztest auf ihre Sensitivität geprüft werden. Da die Antibiotika nur die Erregerzellen bekämpfen und auf die Toxinwirkungen des Erregers keine Auswirkungen haben, ist zumeist eine zusätzliche symptomatische Therapie notwendig. Diese besteht je nach auftretendem Krankheitsbild aus Flüssigkeitssubstitution und der Gabe von Novalgin, Prednisolon oder Diuretika (11). Auch eine Dialyse kann erforderlich sein. Beim Injektionsmilzbrand sind ein chirurgisches Debridement und das Einlegen einer Drainage angebracht (4). Beim Hautmilzbrand ist ein chirurgisches Vorgehen hingegen kontraindiziert.

Bei der postexponentiellen Prophylaxe der Menschen gelten wiederum die beiden Antibiotika Ciprofloxacin und Doxycyclin als Methode der Wahl (1). Die Dosierungen hierbei betragen für Ciprofloxacin 500 mg und für Doxycyclin 100 mg alle 12 Stunden *per os* (11). Die Dauer der Therapie ist davon abhängig, ob eine Impfung gegen Milzbrand erfolgt ist. Bei Impfung kann die Medikamentengabe auf 30 Tage verkürzt werden. In Deutschland ist jedoch kein Impfstoff zugelassen, sodass eine Impfung der Patienten nicht möglich ist. Hierbei beträgt die Therapie 60 Tage.

1 Einleitung

1.3 Epidemiologie

Milzbrand ist eine weltweit vorkommende Zoonose. Die meisten Säugetiere sowie der Mensch gelten als empfänglich (11). Hierbei bestehen jedoch Unterschiede in der Ausprägung der Empfänglichkeit. So stehen Wiederkäuer an oberster Stelle, gefolgt von Einhufern. Deutlich geringer empfänglich sind die Menschen gefolgt von Schweinen und Fleischfressern.

In einigen Regionen Afrikas und Asiens ist Milzbrand hyperendemisch. Dies ist insbesondere eine Folge der unzureichenden Desinfektions- und Dekontaminationsmaßnahmen nach dem Auftreten der Krankheit. So fehlt unter anderem oft eine effiziente Kadaverbeseitigung, wodurch eine effektive Sporenverbreitung von *B. anthracis* im Erdboden möglich wird. Dies ist die Hauptquelle für eine Sporenkontaminierung des Bodens (8).

In Deutschland, sowie im restlichen Mittel- und Nordeuropa, tritt Milzbrand nur sporadisch auf. Der letzte Ausbruch bei Weidetieren in Deutschland erfolgte im Juli 2012 nahe Stendal in Sachsen-Anhalt an der Elbe, bei dem zehn Rinder verstarben (19).



Abb. 3: Bergung einer an Milzbrand verstorbenen und in der Elbe abgetriebenen Mutterkuh der im Juli 2012 betroffenen Rinderherde in Sachsen-Anhalt (Quelle: DAPD)

Insbesondere durch Überschwemmungen, bei welchen die Sporen durch

1 Einleitung

fließendes Wasser mittransportiert werden können, gelangen Sporen wieder an die Erdoberfläche und führen so zu Infektionen von Weidetieren.

Beim Menschen entsteht die Krankheit Milzbrand meist durch den Kontakt mit erkrankten Tieren oder deren sporenhaltigen Produkten, zum Beispiel Wolle oder Häuten (11). Jedoch ist eine Erkrankung durch jeden Kontakt mit Sporen des Erregers denkbar, wie z. B. durch Mikroläsionen in der Haut, Inhalation, Ingestion oder Injektion verunreinigten Materials. Eine Übertragung des Milzbrandes von einem erkrankten Menschen auf andere Menschen wurde bislang nicht beobachtet (7). Insekten- und Vogelvektoren werden jedoch in neuerer Zeit diskutiert (15).

1.4 *B. anthracis* als biologisches Agens

Dem natürlich auftretenden Infektionsgeschehen steht die Nutzung von Milzbrand als Biowaffe gegenüber. Die leichte Verfügbarkeit, die einfache Anzucht, die hohe Resistenz der Sporen und die Möglichkeit einer aerogenen Infektion durch die lungengängigen Sporen, machten und machen diesen Erreger für diesen Missbrauch attraktiv (2, 9).

Während beider Weltkriege haben verschiedene Länder, unter anderem Deutschland und die Vereinigten Staaten von Amerika, Versuche zum Einsatz von *B. anthracis* durchgeführt und den Erreger munitionsfertig als biologische Waffe produziert (1, 20). Japan führte während der Besetzung Chinas Menschenversuche mit Milzbrand durch (20). Auch die Freisetzungsexperimente des britischen Militärs auf der Insel Gruinard im Jahr 1943 (9) oder auch die aufgrund des Lecks eines Filters der Biowaffenfabrik in Sverdlovsk im Jahr 1979 an Lungenmilzbrand verstorbenen Menschen (21) zeugen von staatlich geförderten Aktivitäten.

Es wird davon ausgegangen, dass momentan mindestens 13 Länder Programme zur Nutzung von biologischen Kampfstoffen, inklusive dem Erreger *B. anthracis*, besitzen (1). Durch die Briefanschläge im Jahr 2001 in Amerika, wurde gezeigt, dass *B. anthracis* auch bei terroristischen

1 Einleitung

Aktionen eingesetzt werden kann (1, 2).

Der Erreger *B. anthracis* wird der Risikogruppe 3 gemäß der Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (BioStoffV) zugeordnet (11, 22). Damit können Arbeiten mit Milzbrand nur in einem Labor der Schutzstufe 3 durchgeführt werden (11, 22).

Weiterhin besteht Anzeigepflicht bei Tieren und Meldepflicht beim Menschen. Die Anzeigepflicht ist in der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) festgelegt (23). Das Tierseuchengesetz (TierSG) regelt die Maßnahmen nach dem Auftreten von Milzbrandfällen bei Tieren (18). So ist unter anderem festgelegt, dass der zuständige beamtete Tierarzt bestimmt, ob und welche Maßnahmen an erkrankten Tieren und deren Kadavern oder auch an verdächtigen Tieren durchgeführt werden. Die Meldepflicht beim Menschen sowie das Vorgehen bei einer Infektion mit Milzbrand sind in dem Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (IfSG) festgelegt (24).

1.5 Antibiotika-Resistenzen

Die Bildung von Antibiotika-Resistenzen in Bakterien stellt in der heutigen Medizin ein großes Problem dar. Immer mehr Bakterien entwickeln solche Resistenzen mit teilweise sehr unterschiedlichen Mechanismen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Resistenz (25). Primär bedeutet, dass der Erreger natürlicherweise resistent reagiert. Ein Beispiel dafür ist die Resistenz von gram-negativen Erregern gegen Penicilline der ersten Generationen, wie das Benzylpenicillin und das Procainpenicillin (25). Die sekundäre Resistenz ist die erworbene Resistenz, welche durch verschiedenste Mechanismen hervorgerufen werden kann. So kann ein Bakterium die Struktur der eigenen Membranproteine verändern, sodass die Zellmembran undurchlässig für das Antibiotikum wird. Ein weiterer Mechanismus ist die

1 Einleitung

Bildung von Enzymen, die das Chemotherapeutikum abbauen beziehungsweise seine Struktur in einer Art und Weise verändern, dass es nicht mehr an seinen Angriffsort anbinden kann. Dies geschieht unter anderem durch die beiden Enzyme β -Lactamase, welches Penicilline abbaut, und Cephalosporinase, welches die Wirkung Cephalosporine verhindert (10, 25). Auch das Vorhandensein von Efflux-Pumpen vermindert die Wirksamkeit eines Antibiotikums, denn diese transportieren das Chemotherapeutikum aus der Zelle heraus, sodass die Konzentration dessen am Angriffsort vermindert wird (26). Es existieren weiterhin sogenannte Antibiotika-Resistenz-Gene (27). Dies sind Gene, welche die Struktur des Angriffsortes ausbilden. Mutationen, wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen, innerhalb der Gene verändern diese Struktur, sodass das Antibiotikum nicht mehr daran binden und somit keine Wirkung erzielen kann. Dieser Mechanismus ist unter anderem bekannt für Rifampicin, Aminoglykoside und Fluorochinolone (27, 28).

1.5.1 Fluorochinolon-Resistenz

Im Anschluss an die Diagnose *B. anthracis* sollte immer ein Antibiotika-Empfindlichkeitstest durchgeführt werden, um eine optimale Therapie zu gewährleisten. Bisher wurden keine Milzbrandfälle bestätigt, bei welchen sich *B. anthracis* als resistent gegen Ciprofloxacin erwies. Jedoch wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass der Erreger die Möglichkeit besitzt solche Resistenzen auszubilden (26, 29, 30).

Die Region, die Resistenzen gegen Fluorochinolone, zu welchen auch das Ciprofloxacin (= CIP) zählt, hervorruft, ist die sogenannte Quinolone Resistance Determining Region (= QRDR) (31, 32). Sie besteht aus den vier Genen *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*. Diese kodieren die beiden Enzyme Gyrase (*gyrA*₂*gyrB*₂) und Topoisomerase IV (*parC*₂*parE*₂), welche die Angriffsstelle der Chinolone darstellen. Durch das Hemmen dieser Enzyme, deren Funktion in der Koordination der räumlichen Anordnung der DNA durch die Änderung des Verdrehungsgrades der Doppelstränge während

1 Einleitung

der DNA-Synthese besteht, kann das Bakterium die DNA-Synthese nicht durchführen, worauf der Zelltod durch Doppelstrangbruch folgt (31).

Untersuchungen zum Resistenzverhalten gegen CIP in *B. anthracis* wurden unter anderen von *Price et al.* (2003) mittels Schaffung resistenter Stämme durchgeführt (26). Hierbei wurde erkannt, dass Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, = SNPs) innerhalb der QRDR zu erhöhten minimalen Hemmstoffkonzentrationen (= MHK-Werten) führen. Weiterhin fiel auf, dass ein SNP im Gen *gyrA* immer zuerst und bei gering erhöhten MHK-Werten auftritt und dass andere SNPs in den Genen *gyrA*, *gyrB* und *parC* bei nächsthöheren MHK-Werten folgen. Nach *Price et al.* (2003) wurden ähnliche Studien durchgeführt, welche alle ein vergleichbares Ergebnis lieferten (26, 27, 33, 34). Es entstanden mit wenigen Ausnahmen die gleichen SNPs innerhalb der QRDR. Differenzen bestanden hauptsächlich in der Reihenfolge, in welcher die SNPs entstanden. Hierbei trat der SNP im Gen *gyrA* an Stelle 254 mit einem Basenwechsel von Cytosin zu Thymin immer primär auf. Die Unterschiede lagen in den darauf folgenden SNPs. Alle in der Literatur beschriebenen SNPs im Rahmen einer CIP-Resistenz von *B. anthracis* und *B. cereus* sind in der Tab. 1 aufgeführt. So wurden in den Genen *gyrA*, *gyrB* und *parC* jeweils drei mögliche SNPs gefunden. Keine Studie konnte SNPs im Gen *parE* feststellen.

1 Einleitung

Tab. 1: In der Literatur beschriebene CIP-Resistenz verursachende SNPs bei *B. anthracis* (26, 27, 33, 34)

<i>Gen</i>	<i>betroffenes bp</i>	<i>Basenwechsel Wildtyp > Mutation</i>	<i>Aminosäurewechsel Wildtyp > Mutation</i>
<i>gyrA</i>	254	C > T	Ser > Leu
	265	G > A	Glu > Lys
	266	A > C	Glu > Ala
		A > G	Glu > Gly
<i>gyrB</i>	1309	G > A	Asp > Asn
	1408	A > G	Asn > Asp
	1423	A > G	Asn > Asp
<i>parC</i>	242	C > T	Ser > Phe
		C > A	Ser > Tyr
	244	T > C	Ser > Pro
	253	G > A	Glu > Lys
<i>parE</i>	-	-	-

Da nicht bei allen hoch resistenten *B. anthracis* Stämmen mehrere SNPs auftraten, untersuchten einige Studien, ob zusätzlich erhöhte Leistungen von Efflux-Pumpen zu der entstandenen Resistenz führten (26, 34, 35). So konnten starke Hinweise darauf gefunden werden, dass bei hochresistenten Erregern neben Mutationen in der QRDR auch Efflux-Pumpen eine wichtige Rolle innehaben. Wie genau dieser Mechanismus in *B. anthracis* funktioniert, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt (26).

Herkömmliche Antibiotika-Empfindlichkeitstests, wie der Gradientendiffusionstest oder der Mikrodilutionstest, benötigen eine vorherige kulturelle Anzucht des Erregers. Dadurch und durch die darauf folgende Durchführung des Tests beträgt die Dauer, bis ein Ergebnis dessen vorliegt, mehrere Tage (36). Dies kann das Überleben von Infizierten gefährden.

1.6 Ziele der Arbeit

Ein molekularer Schnelltest, um die Ciprofloxacin-Sensitivität von *B. anthracis* in einem Krankheitsfall direkt aus klinischem Material ohne

1 Einleitung

kulturelle Anzüchtung festzustellen, existiert bisher nicht. Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll ein solcher Schnelltest basierend auf einer real-time-PCR Methode entwickelt werden.

Um diesen Schnelltest entwickeln zu können, benötigt man zuerst geeignete Mutationskontrollen. Dafür werden durch natürliche Selektion Ciprofloxacin-resistente Mutanten des *B. cereus* Stammes ATCC10987 hergestellt. *B. cereus* Mutanten, welche SNPs innerhalb der QRDR aufweisen, werden als Ciprofloxacin-resistente Mutationskontrollen eingesetzt. Zudem werden synthetische Templates als Mutationskontrollen genutzt. Diese Oligonukleotide werden jeweils Längen von ca. 100 bp besitzen und die SNPs der Genabschnitte der vier relevanten Gene, welche sie darstellen, beinhalten.

Der Schnelltest soll es ermöglichen, innerhalb von zwei Stunden nach der Diagnose Milzbrand, die Sensitivität des krankheitsauslösenden *B. anthracis* hinsichtlich Ciprofloxacin, durch den Nachweis der oben genannten SNPs innerhalb der QRDR, zu bewerten und so eine schnellstmögliche effektive Therapie des Patienten zu gewährleisten.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Templates

2.1.1 Organismen

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich der *B. cereus* Stamm ATCC10987 und seine Mutanten verwendet, da diese die Mutationskontrollen für die Entwicklung des Schnelltestes darstellten. Zudem wurden die DNAs verschiedener *B. anthracis* Stämme aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Bundeswehr in München, sowie einige DNAs von *B. cereus* Stämmen der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU München untersucht. Sämtliche *B. anthracis* und *B. cereus* Stämme sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *B. anthracis*, *B. cereus* und andere *Bacillus* spp. Stämme

Spezies	Name	Herkunft
<i>B. anthracis</i>	Ames Ancestor	Färse Beefmaster, Texas; United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, USA (37)
<i>B. anthracis</i>	3236, 3265, 3266, 3350, 3352, 3354, 3355, 3357, 3360, 3361, 3362, 3366, 3369, 3370, 3371, 3373, 3376, 3390, 3410, 3411, 3432, 3434, 3435, 3442, 3443, 3447, 3597, Italien	Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Bundeswehr
<i>B. anthracis</i>	Sterne Strain 34F2	Sterne M.; Onderstepoort Veterinary Research Institute, Südafrika (38)
<i>B. cereus</i>	ATCC10987	ATCC (= American Type Culture Collection), USA

2 Material und Methoden

Spezies	Name	Herkunft
<i>B. cereus</i>	Idaho Falls	Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Bundeswehr
<i>B. cereus</i>	E33L	Zebrakadaver, Namibia (39)
<i>B. cereus</i>	288, 290, 1354, 1356, 2690, 2698, 2700, 2815, 2818, 2892, 2893, 2894, 2895, 2896, 2897, 2898, 2899, 2900, 2901, 2902, 2903, 2904, 2905, 3092, 3093, 3094, 3095, 3096, 3097, 1301, 1307, 1491, 1492, 1493, 1499, 1505, 1506, 1522, 1543, 1578, 1579, 2855, 2947, 2980, 2982, 3011, 3013, 3040, 3041, 3042, 3075, 87, 135, 165, 280, 1305/1, 1471, 1672, 1673, 1680, 1806, 1807, 2261, 2262, 2350, 2572, 2594, 2708, 3016, 3032, 3077, 266, 33, 108, 186, 187, 1304, 1749, 2589, 2591, 2646, 2724, 2830, 2832, 2856, 2866, 2868, 3045, 3068, 3080, 3090, 3098, 3109	Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU München
<i>B. mycoides</i>	B547	Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Bundeswehr
<i>B. brevis</i>	DSM30	DMSZ (= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Deutschland
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC33679	ATCC (= American Type Culture Collection), USA
<i>B. pumilis</i>	<i>B. pumilis</i>	AG Bierbaum, Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, Bonn (40)

2 Material und Methoden

2.1.2 Synthetische Templates

Da der Großteil der Mutanten des *B. cereus* Stammes ATCC10987 keine geeigneten Mutationskontrollen darstellten und somit kein Positivmaterial für die zu entwickelnden Schnelltests vorhanden war, wurden künstliche Oligonukleotide als Mutationskontrollen genutzt. Diese hatten eine Länge, welche die beiden Primersequenzen und die von den Primern umgebende Sequenz umfasste. Die synthetischen Templates beinhalteten die SNPs des Genabschnitts, den sie darstellten. Als Vorlage für die Synthese wurde das Genom des *B. anthracis* Ames Ancestor genutzt. Das Design erfolgte durch das Computerprogramm BioEdit (Carlsbad, USA), indem Alignments der Primer- und SONDENSEQUENZEN mit dem Genom des *B. anthracis* Ames Ancestor durchgeführt worden. Die Sequenz zwischen dem 5'-Ende des Forward-Primers und dem 3'-Ende des Reverse-Primers wurde als Sequenz für die synthetischen Templates ausgewählt. Die Herstellung wurde anschließend von der Firma TibMolBiol (Berlin) übernommen. In der Tab. 3 sind alle Sequenzen der künstlichen Templates gelistet.

2 Material und Methoden

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete synthetische Templates

Name	Sequenz 5'-3'
T_TM_gyrA_G	GTTGGTGAAGTAATCGGTAAGTATCACCCCT CATGGTGATTTAGCTGTTTATAGAACGATGG TACGTATGGCGCAAGATTTTCAGTCAACGT
T_TM_gyrA_C	GTTGGTGAAGTAATCGGTAAGTATCACCCCT CATGGTGATTTAGCTGTTTATACAACGATGG TACGTATGGCGCAAGATTTTCAGTCAACGT
T_TM_gyrB1408	AACGTTGAAAAGGCAAGATTAGA TAAATCTTATCTGACGATGAAGTGCGTACAAT TATTACTGCAATTGGTACGAACATTG
T_TM_gyrB1428	CGTTGAAAAGGCAAGATTAGATAAAATCTTA TCTAACGATGAAGTGCGTGCAATTATTACTGCA ATTGGTACGAACATTGGCGGAGATTTTGAT
T_TM_parC_T	CGGTAACGTTATTGGTAACTATCACCCGCA CGGTGATTTCCCTGTATATAAAGCGATGGTAC GTTTAAGTCAAACCTTGAAAGTACGT
T_TM_parC_A	CGGTAACGTTATTGGTAACTATCACCCGC ACGGTGATTACCCTGTATATAAAGCGATGG TACGTTTAAGTCAAACCTTGAAAGTACGT
T_MM_T_gyrA254	AAGTATCACCCCTCATGGTGATTCAGC TGTTTATRVAACGATGGTACGTATGGCGC AAGATTTTCAGTCAACGTTATATGCTTGT
T_MM_T_parC242	ACCCGCACGGTGATTTTCYCTGTATATRAA GCGATGGTACGTTTAAGTCAAACCTTGAAAGT ACGTAATGTTTTAGTTGAGA
T_MM_A_parC242	ACCCGCACGGTGATTACYCTGTATATRA AGCGATGGTACGTTTAAGTCAAACCTTGAA AGTACGTAATGTTTTAGTTGAGA
T_MM_parC244	CCCGCACGGTGATTHCCCTGTATATR AAGCGATGGTACGTTTAAGTCAAACCTTGAAA GTACGTAATGTTTTAGTTGAGATGCATGGTAAT AATGGTAGTG
T_MM_parC253	TGACTTAAACGTACCATCGCTTTATATACAGRG DAATCACCGTGCGGGTGATAGTTACCAATAAC GTTACCGACTGTTTTAGCCGACTTACGGAA

R= A/G; V= A/C/G; Y= C/T; H= A/C/T; D= A/G/T

2 Material und Methoden

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedium: Mueller-Hinton-II-Agar

Der Mueller-Hinton-II-Agar (= MHII-Agar) ist ein festes Vollmedium. Er wurde zur Anzucht des *B. cereus* ATCC10987 genutzt, sowie zur Generierung Ciprofloxacin-resistenter Mutanten. Des Weiteren wurden die Gradientendiffusionstests hinsichtlich der Empfindlichkeit des *B. cereus* ATCC10987 und seiner Mutanten gegen Ciprofloxacin auf dem MHII-Agar durchgeführt. Die Zusammensetzung des Agars ist in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung Mueller-Hinton-II-Agar nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg)

Substanz	Menge
Rindfleischextrakt (aus 300g)	2 g/l
Säurehydrolysat von Casein	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17 g/l
Aqua dest	ad 1 l

2.2.2 Antibiotika: Chinolone (= Gyrasehemmer)

Die Chinolone zählen zu den bakteriziden Antibiotika (32). Ihre Vertreter werden in verschiedene Generationen unterteilt. Nalidixinsäure ist ein Vertreter der ersten Generation, welche ein kleines Wirkungsspektrum vornehmlich im Bereich der gramnegativen Bakterien besitzen. Die neueren Generationen besitzen ein breites Wirkungsspektrum, das sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien einschließt. Zu den „neuen“ Chinolonen zählen unter anderem Ciprofloxacin, Norfloxacin und Marbofloxacin (25).

Der Wirkmechanismus der Chinolone besteht in der Hemmung der bakteriellen Topoisomerasen vom Typ II (32). Dies sind die Topoisomerase IV und die Gyrase. Dadurch wird die DNA-Synthese der Bakterien gehemmt und die Zellen sterben.

Chinolone können Gewebe, wie z.B. das Lungengewebe, sehr gut

2 Material und Methoden

penetrieren. Daher entfalten sie auch eine gute Wirkung gegen intrazelluläre Erreger (32).

Ciprofloxacin, ein Vertreter der zweiten Generation der Chinolone, gilt als Mittel der Wahl gegen Milzbrand (31).

2.2.2.1 Ciprofloxacin

Es wurden zwei Stammlösungen von Ciprofloxacin (=CIP) unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Für die niedrig konzentrierten ciprofloxacinhaltigen MHII-Agar-Platten (=CIP-MHII-Agar) wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Ab einer Konzentration von 16 µg/ml in den Agar-Platten wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml genutzt. Diese wurden in Portionen von 1 ml bei -20 °C tiefgefroren. Je nach der gewünschten Konzentration an CIP im verwendeten MHII-Agar wurden verschiedene Mengen der Stammlösung zu 100 ml flüssigem Agar gegeben.

2.2.2.2 Nalidixinsäure

Es wurde eine Stammlösung Nalidixinsäure (=NAL) mit der Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Diese wurde in Portionen von 1 ml bei -20 °C tiefgefroren. Je nach der gewünschten Konzentration an NAL im verwendeten MHII-Agar wurden verschiedenen Mengen der Stammlösung zugegeben.

2.2.3 Herstellung der antibiotikahaltigen Agar-Platten

Der MHII-Agar lag als feste, vorsterilisierte 100 ml Portion in einem Erlenmeyerkolben vor. Diese Kolben, die zudem je einen Rührfisch enthielten, wurden auf einer magnetischen Heizplatte langsam erhitzt bis sich der Agar verflüssigte. Nach Abkühlung des Agars auf eine Temperatur

2 Material und Methoden

von ca. 40 °C wurde rasch vor der einsetzenden Verfestigung des Agars ein definiertes Volumen der jeweiligen Stammlösung des zu verwendenden Antibiotikums beigegeben. Nach dem sorgfältigen Mischen der antibiotikahaltigen Lösung und dem noch flüssigen MHII-Agar wurden pro 100 ml des Agars fünf Agarplatten gegossen. Diese wurden anschließend ca. 10 min stehen gelassen, sodass der Agar abkühlte und sich verfestigte, bevor sie genutzt werden konnten.

2.2.4 Inkubationsbedingungen

Die beimpften MHII-Agar-Platten wurden 24 bis 40 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

2.2.5 Selektion der Ciprofloxacin-resistenten Mutanten

Die Generierung der CIP resistenten Mutanten des *B. cereus* Stammes ATCC10987 wurde in verschiedenen Schritten vergleichbar zu dem von Price et al. (2003) beschriebenen Vorgehen durchgeführt (26). Sie wird in der Abb. 4 schematisch dargestellt.

Es erfolgten ein Mikrodilutions- sowie ein Gradientendiffusionstest, um die minimale Hemmstoffkonzentration (= MHK) für den Wildtyp des *B. cereus* zu bestimmen. Diese betrug laut Mikrodilutionstest und Gradientendiffusionstest 0,125 µg/ml. Daraufhin wurde der *B. cereus* zunächst auf einem MHII-Agar, welchem kein CIP zugegeben wurde, angezogen. Von diesem Agar wurden mehrere Einzelkolonien jeweils nach Lösung in steriler PBS gelöst und auf einem CIP-MHII-Agar mit einer CIP-Konzentration von 0,5 µg/ml ausplattiert. Von diesem Agar wurden wiederum einzelne Kolonien auf einem gleich-konzentrierten CIP-MHII-Agar ausgestrichen. Ein wiederholt erneuter 3-Ösen-Ausstrich auf einem Agar mit der gleichen Konzentration an CIP erfolgte, bis innerhalb von 24 Stunden typische *B. cereus* Kolonien wuchsen. Im nächsten Schritt wurden

2 Material und Methoden

Kolonien auf einer Agar-Platte mit der doppelten Konzentration an CIP ausplatiert. Erneut erfolgte ein Ausstreichen auf dem Agar mit dieser Antibiotikakonzentration bis eine typische Koloniemorphologie zu erkennen war. Diese Schritte werden wiederholt bis der *B. cereus* auf einer Agarplatte mit der abschließenden Konzentration von 256 µg/ml wuchs.

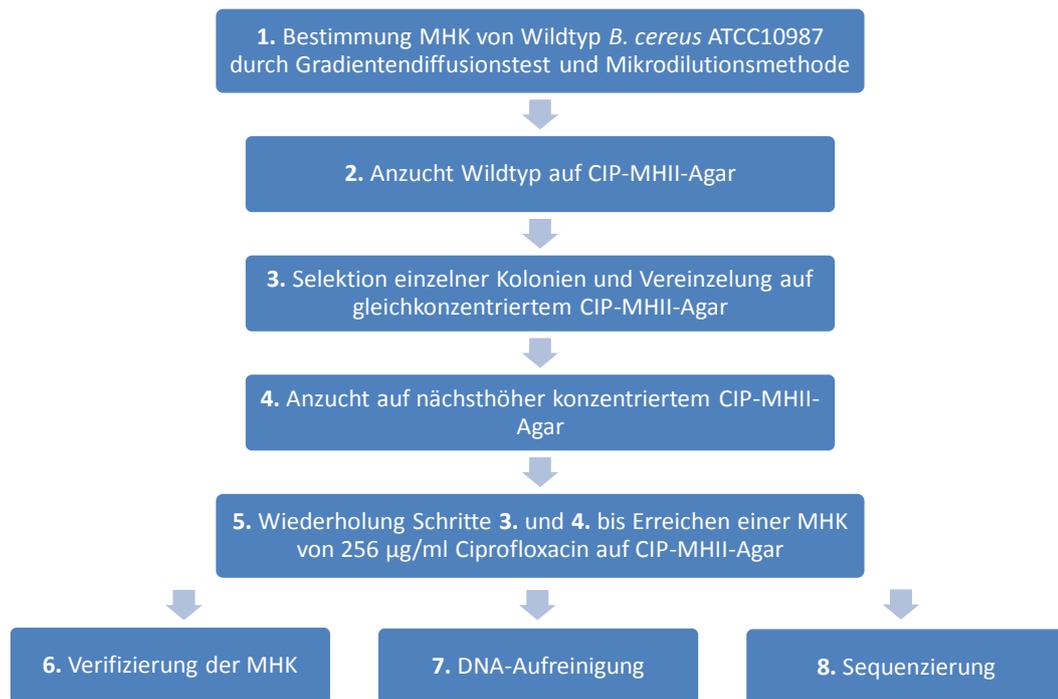


Abb. 4: Schema der Vorgehensweise zur Selektion CIP-resistenter *B. cereus* Mutanten

2.2.6 Selektion der Nalidixinsäure-resistenten Mutanten

Die Generierung NAL resistenter *B. cereus*-Mutanten erfolgte analog zur Generierung der CIP resistenten Mutanten.

Die im ersten Schritt bestimmte MHK betrug für den *B. cereus* Wildtyp 6 µg/ml. Die Anzucht erfolgte zuerst auf einem MHII-Agar, welcher eine NAL-Konzentration von 20 µg/ml enthält.

2 Material und Methoden

2.2.7 Überprüfung der minimalen Hemmstoffkonzentration

In Verlaufe der Generierung der *B. cereus* Mutanten wurden diese, wie auch zu Beginn der *B. cereus* ATCC10987 WT, wiederholt auf ihre Empfindlichkeit gegenüber CIP und NAL getestet. Hierfür wurden Gradientendiffusionstests (BioMérieux, Marcy-l'Etoile) verwendet.

Auch die *B. cereus* Stämme des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU München wurden auf ihre allgemeine Resistenzlage gegenüber verschiedenen Antibiotika, besonders gegenüber CIP, untersucht. Hierfür wurden Mikrodilutionstests (Merlin, Bornheim-Hersel) durchgeführt.

2.2.7.1 Gradientendiffusionstest

Das Wirkprinzip eines Gradientendiffusionstests (auch unter dem Markennamen E(R)-Test bekannt) besteht in der Wachstumsinhibierung der Bakterien auf einem Festmedium, welches einen Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums enthält (36). Dieser Konzentrationsgradient entsteht durch die Diffusion des Antibiotikums von dem Streifen in den Agar. Man erkennt, wie in Abb. 5 dargestellt, ein ellipsoides Ausbleiben des Wachstums der Bakterien um einen antibiotikahaltigen Streifen herum. Die quantitative Auswertung erfolgt durch die Festlegung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK). Diese bezeichnet die Schnittstelle der ellipsoiden Wachstumsbegrenzung mit dem antibiotikahaltigen Streifen (36).

2 Material und Methoden

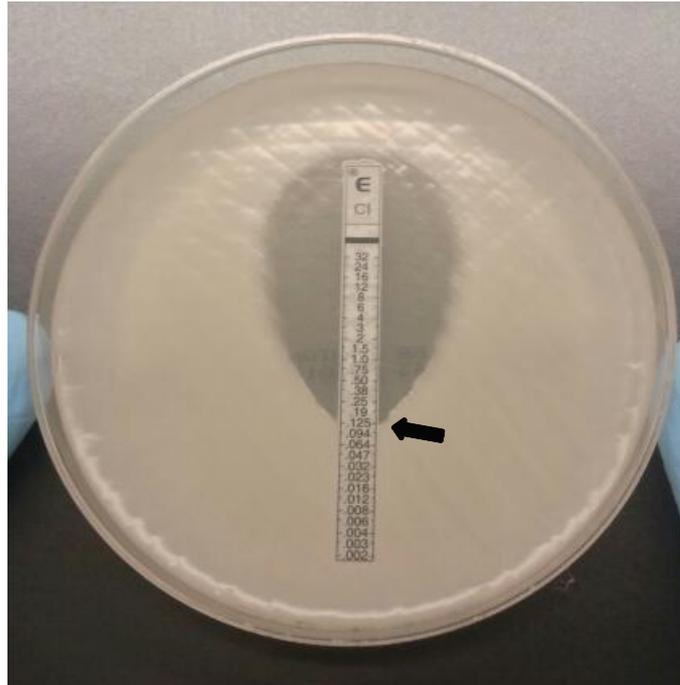


Abb. 5: quantitative Auswertung eines Gradientendiffusionstests. Die MHII-Agar-Platte ist komplett mit dem zu testenden Bakterienstamm bewachsen, mit Ausnahme eines ellipsoiden Bereiches um den antibiotikahaltigen Streifen herum. Die Schnittstelle (schwarzer Pfeil) der Wachstumsgrenze mit dem Streifen definiert den MHK-Wert. Dieser beträgt hier 0,125 µg/ml. Je höher die Konzentration des Antibiotikums im Streifen, umso höher ist die Konzentration des Antibiotikums im umgebenden Agar und umso weiter entfernt endet das Wachstum des getesteten Bakterienstammes. Dies begründet die typische ellipsoide Form der Wachstumsbegrenzung.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 50 µl einer bakterienhaltigen PBS-Lösung, welche auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt wurde, gleichmäßig auf einer MHII-Agar-Platte ausplattiert. Auf den beimpften Agar wurde der antibiotikahaltige Streifen aufgelegt. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch das Ablesen der MHK.

2.2.7.2 Mikrodilutionstest

Das Prinzip des Mikrodilutionstests ist die Wachstumsinhibierung von Bakterien in antibiotikahaltigen Flüssigmedien (36). Dabei wird eine 96-Lochplatte, welche mit einem Flüssigmedium, das verschiedene Antibiotika

2 Material und Methoden

in jeweils verschiedenen Konzentrationen je Loch enthält, belegt ist, mit einer bakterienhaltigen Lösung beimpft. Für die Auswertung (siehe Abb. 6) gilt, dass die niedrigste Konzentration des jeweiligen Antibiotikums, welche ein Wachstum der Bakterien verhindert, die minimale Hemmstoffkonzentration darstellt (36).

2 Material und Methoden

Nummer:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
			AMC	CAZ	IMP	CIP	LEV	GEN	CLI	DOX	ERY	CMP		
		R	> <input type="checkbox"/>	> <input checked="" type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>	R	
A	> <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	64/32 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>	64 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	64 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>
B	> <input checked="" type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	32/16 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>
C	PEN < <input type="checkbox"/>	0,125 <input type="checkbox"/>	16/8 <input checked="" type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	1 <input checked="" type="checkbox"/>	RIF < <input type="checkbox"/>
D	< <input type="checkbox"/>	0,063 <input type="checkbox"/>	8/4 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	8 <input checked="" type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	< <input type="checkbox"/>
E	> <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>	4/2 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	1 <input checked="" type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	4/46 <input type="checkbox"/>	> <input type="checkbox"/>
F	> <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>	2/1 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	0,5 <input checked="" type="checkbox"/>	0,125 <input checked="" type="checkbox"/>	0,125 <input checked="" type="checkbox"/>	1 <input checked="" type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	0,5 <input checked="" type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	2 <input checked="" type="checkbox"/>	2/38 <input checked="" type="checkbox"/>	TXS < <input type="checkbox"/>
G	STR < <input type="checkbox"/>	4 <input checked="" type="checkbox"/>	1/0,5 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	0,063 <input type="checkbox"/>	0,063 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	1/19 <input type="checkbox"/>	< <input type="checkbox"/>
H	< <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	0,5/0,25 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	0,125 <input type="checkbox"/>	0,031 <input type="checkbox"/>	0,031 <input type="checkbox"/>	0,25 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	0,125 <input type="checkbox"/>	0,125 <input type="checkbox"/>	0,5 <input type="checkbox"/>	GC <input checked="" type="checkbox"/>	

Abb. 6: Auswertung eines Mikrodilutionstests. Dieses Schema zeigt die Ansicht der, für den Mikrodilutionstest genutzten, Platte von oben. Mit der hier verwendeten 96-Loch-Platte werden die MHK-Werte für 14 verschiedene Antibiotika ermittelt, welche jeweils durch Abkürzungen auf der Abbildung angegeben sind: PEN – Penicillin, STR – Streptomycin, AMC – Amoxicillin/Clavulansäure, CAZ – Ceftazidim, IMP – Imipenem, CIP – Ciprofloxacin, LEV – Levofloxacin, GEN – Gentamicin, CLI – Clindamycin, DOX – Doxycyclin, ERY – Erythromycin, CMP – Chloramphenicol, RIF – Rifampin, TXS – Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Jedes Loch enthält eine bestimmte Konzentration eines Antibiotikums. Dabei ist jedes Antibiotikum in, von unten nach oben, aufsteigenden Konzentrationen in mehreren bzw. allen Löchern, welche farblich zueinander zugeordnet sind, einer Reihe vorhanden. Jede Konzentration sowie jeweils ein Feld unter- und oberhalb bzw. seitlich der Loch-Reihe besitzen ein Kästchen. Durch Kreuze in den entsprechenden Kästchen können drei mögliche Ergebnisse für jedes Antibiotikum festgelegt werden. Genaue MHK-Werte sind durch die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, welche ein Wachstum des zu testenden Bakterienstammes vollständig verhindert, definiert, und werden durch ein Kreuz in dem entsprechenden Feld determiniert, z.B. 0,125 µg/ml für CIP. Wenn innerhalb der Reihe eines Antibiotikums kein Wachstum erfolgt, gilt der Stamm als sensitiv zu diesem Antibiotikum und das Kreuz wird in dem Feld mit dem Symbol < gesetzt oder alternativ in dem untersten Kästchen der jeweiligen Reihe. Ist die Reihe eines Antibiotikums hingegen komplett bewachsen, ist der Stamm als resistent zu definieren und das Kreuz wird in dem Feld mit dem Symbol > getätigt, z.B. PEN. Das orangefarbene Feld zeigt ein Loch, welches kein Antibiotikum enthält und als Wachstumskontrolle (=GC) genutzt wird.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Jeweils 100 µl einer bakterienhaltigen PBS-Lösung, die auf einen McFarland-Standard von 0,5 eingestellt wurde, wurden pro Vertiefung zugegeben. Die beimpfte Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend, wie in Abb.

2 Material und Methoden

6 dargestellt, abgelesen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Qiamp® Mini Kit (Qiagen, Hilden). Dessen Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.3.2 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion

Die konventionelle Form der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde für die Amplifikation von Genabschnitten der selektierten Antibiotikaresistenten Mutanten verwendet. Es wurden dabei vier PCRs durchgeführt, welche relevante Abschnitte der vier Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* umfassten. Die hierbei entstandenen Produkte wurden anschließend DNA-sequenziert, um eventuelle entstandene single nucleotide polymorphisms (=SNPs) identifizieren zu können.

2.3.2.1 Primer

Die für die PCR genutzten Primer sind in Tab. 5 gelistet. Sie wurden über die Firma TibMolBiol (Berlin) bestellt.

2 Material und Methoden

Tab. 5: Liste der für die konventionelle PCR benutzten Primer

PCR-Target	Primername	Sequenz 5'-3'
gyrA	<i>Primer gyrA_F</i>	CAACAAGCACGA ATT CGA
	<i>Primer gyrA_R</i>	GAACCATCATAG TTA TCTTG
gyrB	<i>Primer gyrB_F</i>	CAGAGGCATTTG AAAAGTTC
	<i>Primer gyrB_R</i>	ACGTTAATAATAGGG TACG
parC	<i>Primer parC_F</i>	GGAATTTCTGTTGCA TAACC
	<i>Primer parC_R</i>	CTCCCGCTTGAA GACGT
parE	<i>Primer parE_F</i>	ACCAGCTTCGAT AAGTGG
	<i>Primer parE_R</i>	TAGCTACACTTCTTG TGAGAA

2.3.2.2 Lösungen und PCR-Ansatz

Die vier PCRs (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) wurden jeweils einzeln PCR durchgeführt. Die pipettierten Mengen sind Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 6: PCR-Ansatz der vier konventionellen PCR

Reagens	Firma	Endkonzentration	µl/Reaktion
Qiagen Multiplex PCR 2x Master Mix	Qiagen, Hilden	5 µM	25,00
PCR Wasser	5-Prime, Hamburg		16,00
Primer F	TibMolBiol, Berlin	0,4 µM	2,00
Primer R	TibMolBiol, Berlin	0,4 µM	2,00
Proben-DNA			5,00

2.3.2.3 Thermoprofil

Für die vier PCRs wurde jeweils das gleiche, in Tab. 7 aufgeführte, Thermoprofil verwendet. Die Durchführung erfolgte am Gerät Gene Amp PCR System 2400 (-B-) (Perkin Elmer, Waltham, USA).

2 Material und Methoden

Tab. 7: verwendetes Thermoprofil für die vier konventionellen PCRs

<i>Parameter</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Zeit</i>
Aktivierung	94	1	00:05:00
Amplifikation	94	50	00:01:00
	55		00:01:00
	72		00:01:00
Nachsynthese	72	1	00:10:00
Abkühlung	4		∞

2.3.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in den Flachbett-Apparaturen MiniGel II (VWR, Darmstadt), Horizon 58 (Life Technology, Darmstadt) oder PowerPac 300 (BioRad, Hercules, USA). Das verwendete Agarosegel hatte eine Konzentration von 2 %. Für die Herstellung des Gels wurde die Agarose (NEE0 Ultra Rothi Agarose, Carl Roth, Karlsruhe) in einer entsprechenden Menge in TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe Tab. 8, vor Gebrauch 1:50 mit Aqua dest. Verdünnt, im Haus hergestellt) in einem Erlenmeyerkolben erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine Form gegossen. Nach der Verfestigung des Gels wurde dieses in die Flachbett-Apparatur eingelegt und mit TAE-Puffer komplett übergossen.

Tab. 8: Zusammensetzung Gebrauchslösung 50 x TAE-Puffer

<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Menge</i>
TRIS (Tris- (hydroxymethyl)-amino-methan)	242 g
0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	100 ml
0,2 M Essigsäure	57,1 ml
NaOH	auf pH 8,0 einstellen
deionisiertem Wasser	auf 1L auffüllen

Im nächsten Schritt erfolgte die Belegung des Gels mit der Proben-DNA. Hierfür wurden je 5 µl Probe mit 5 µl 1x DNA-Gel-loading Buffer (Eppendorf, Hamburg) versetzt. Dieses Gemisch wurde dann in eine Vertiefung in das Agarosegel eingegeben. Zudem wurden 5 µl des DNA-Leiters 100 bp DNA-

2 Material und Methoden

Leiter (0,05 µg/µl, Carl Roth, Karlsruhe) in einer separaten Vertiefung vorgelegt. Die Gelelektrophorese wurde für 30 min bei konstant 100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels für ca. 15 min mit GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) und eine Entfärbung mit Aqua dest. für ca. 5 min. Mit dem Gerät ChemiDoc XRS (BioRad, Hercules, USA) wurde eine Abbildung des Gels hergestellt, welche die Grundlage für die Auswertung der Gelelektrophorese darstellt.

2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Produkte der vier konventionellen PCRs wurde durchgeführt, um CIP- oder NAL-Resistenz auslösende SNPs in den Mutanten zu identifizieren.

2.3.3.1 Aufreinigung PCR-Produkte

Um die entstandenen Amplifikate von Oligonukleotiden, Nukleotiden, der Taq-Polymerase und anderen im PCR-Produkt enthaltenen Stoffen zu trennen, wurde eine Reinigung der PCR-Produkte durchgeführt. Diese Aufreinigung erfolgte mit dem Qiagen® Purification Kit (Qiagen, Hilden) und erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde zur Kontrolle des Vorhandenseins von DNA im Produkt der Aufreinigung erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2.3.3.2 In-House-Sequencing

Ein Teil der DNA der Mutanten wurde im Institut für Mikrobiologie sequenziert.

2 Material und Methoden

2.3.3.2.1 Farbmarkierung

Die Farbmarkierung der zu sequenzierenden Probe erfolgte zweimal pro Probe, im ersten Ansatz mit dem Forward Primer und im zweiten Ansatz mit dem Reverse Primer der zuvor durchgeführten PCRs, entsprechend dem in Tab. 9 aufgeführten Probenansatz.

Die Farbmarkierung erfolgte im Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Waltham, USA) mit dem in Tab. 10 gelisteten Thermoprofil.

Tab. 9: Probenansatz für Farbmarkierung

<i>Reagens</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Firma</i>	<i>µl/Reaktion</i>
Master Mix Big Dye		Qiagen, Hilden	4
PCR-Wasser		5-Prime, Hamburg	4
Primer F/R	1 µM	TibMolBiol, Berlin	1
Proben-DNA			1

Tab. 10: Thermoprofil der Farbmarkierung

<i>Parameter</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Zeit</i>
Aktivierung	96	1	00:01:00
Amplifikation	96	25	00:00:10
	50		00:00:05
	60		00:02:00
Abkühlung	4		∞

2.3.3.2.2 Aufreinigung Farbmarkierungs-Produkte

Im Anschluss an die Farbmarkierung wurden die farbmarkierten Proben mit dem Kit Qiagen® Dye Ex 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, welches nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

2 Material und Methoden

2.3.3.2.3 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 96-well-Platten mit jeweils 12 µl Formamid und 3 µl der zu sequenzierenden Probe pro well belegt. Sie erfolgte an dem Gerät 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt).

2.3.3.3 Sequenzierung durch kommerziellen Anbieter

Ein Teil der Sequenzierungen der DNA der Mutanten wurde durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Hierfür wurden 96-well-Platten mit jeweils 25 µl Proben-DNA aus dem Aufreinigungsschritt, welcher im Anschluss an die PCR erfolgte, belegt. Zudem wurden die Primer, je 20 µl für bis zu acht Sequenzierreaktionen, der zuvor durchgeführten PCR mitversandt.

2.3.3.4 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Rohdaten der Sequenzierungen fand durch die beiden Computerprogramme BioEdit (Carlsbad, USA) und BioNumerics (Austin, USA) statt.

2.3.4 Real-Time-PCR

2.3.4.1 TaqMan

Bei auf TaqMan-Chemie basierenden Real-Time-PCRs kommen Sonden zum Einsatz, an welche neben einem Donor-Fluorophor (Donor) ein Quencher-Fluorophor (Quencher) gebunden ist. Diese Sonden binden im Verlauf der PCR an einzelsträngige komplementäre DNA. Der Donor emittiert bei Anregung mit einem Licht bestimmter Wellenlänge Fluoreszenz, während der Quencher, wenn dieser sich in räumlicher Nähe zum Donor befindet, die abgegebene Fluoreszenz absorbiert (41). Somit

2 Material und Methoden

entsteht während der Bindung der Sonde an die DNA keine messbare Fluoreszenz. Durch die Taq-Polymerase wird die Sonde jedoch während des Aufbaus des neusynthetisierten DNA-Doppelstranges abgebaut. Dadurch entfernen sich Donor und Quencher voneinander und der Donor kann ungehindert Fluoreszenz emittieren, welche durch das PCR-Gerät gemessen und ausgewertet werden kann (41).

Für den Nachweis von SNPs nutzt man mehrere Sondenallele. In der Mitte jeder Sondensequenz liegt die zu untersuchende SNP-Stelle. Für jede mögliche Base des SNPs wird eine Sonde zugegeben. Jede dieser Sonden besitzt einen anderen Donor und somit ein eigenes spezifisches Fluoreszenzsignal. Da nur die passende Sonde an die einzelsträngige Proben-DNA bindet, kann man das während der PCR emittierte Fluoreszenzsignal einer Sonde und somit der an der SNP-Stelle vorhandenen Base zuordnen. Es wurden acht verschiedene TaqMan-Protokolle entwickelt. Jedes dieser Protokolle weist einen SNP nach, der CIP-Resistenz verursachen kann.

2.3.4.1.1 Proben

Es wurden der *B. cereus* Wildtyp, eine Auswahl der *B. cereus* Mutanten und der *B. anthracis* Stämme, welche in Tab. 2 aufgelistet sind, sowie künstliche Oligonukleotide, welche in Tab. 3 verzeichnet sind, als Template verwendet.

2.3.4.1.2 Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden unter Zuhilfenahme der Programme Primer3Plus (Bioinformatics, Boston, USA) und Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) erstellt und von TibMolBiol (Berlin) synthetisiert.

2 Material und Methoden

Tab. 11: für TaqMan-PCR verwendete Primer

SNP	Primername	Sequenz 5'-3'
<i>gyrA</i> SNP254 <i>gyrA</i> SNP265 <i>gyrA</i> SNP266	<i>gyrA_F</i>	GTTGGTGAAGTAATCGGTAAG
<i>gyrA</i> SNP254 <i>gyrA</i> SNP265 <i>gyrA</i> SNP266	<i>gyrA_R</i>	ACGTTGACTGAAATCTTGC
<i>gyrB</i> SNP1408	<i>gyrB1408_F</i>	AACGTTGAAAAGGCAAGATTAGA
<i>gyrB</i> SNP1408	<i>gyrB1408_R</i>	CAATGTTTCGTACCAATTGCAG
<i>gyrB</i> SNP1423	<i>gyrB1423_F</i>	CGTTGAAAAGGCAAGATTAGA
<i>gyrB</i> SNP1423	<i>gyrB1423_R</i>	ATCAAAATCTCC GCCAATGT
<i>parC</i> SNP242 <i>parC</i> SNP244 <i>parC</i> SNP253	<i>parC_F</i>	CGGTAACGTTATTGG TAATTATC
<i>parC</i> SNP242 <i>parC</i> SNP244 <i>parC</i> SNP253	<i>parC_R</i>	ACGTACTTTCCAAGTTTGGCTTA

Die Sonden wurden so gestaltet, dass diejenige mit der Wildtypbase im HEX-Kanal (= Hexachloro-6-carboxyfluorescein) detektiert wird, während an die Sonde, welche die Mutationsbase aufweist, der Donor FAM (= 5(6)-Carboxyfluorescein) gekoppelt wurde.

2 Material und Methoden

Tab. 12: für TaqMan-PCR verwendete Sonden

SNP	Base	Sequenz
<i>gyrA</i> SNP254	C	HEX-CCTCATGGTGATTCAGCTGTTTATRVA-BBQ
	T	FAM-CCTCATGGTGATTTAGCTGTTTATRVA-BBQ
<i>gyrA</i> SNP265	G	HEX-YAGCTGTTTATGVAACGATGGTA-BBQ
	A	FAM-YAGCTGTTTATAVAACGATGGTA-BBQ
<i>gyrA</i> SNP266	A	HEX-AGCTGTTTATRAAACGATGGTAC-BBQ
	C	FAM-AGCTGTTTATRGAACGATGGTAC-BBQ
	G	FAM-AGCTGTTTATRCAACGATGGTAC-BBQ
<i>gyrB</i> SNP1408	A	HEX-AAAATCTTATCTAACGATGAAGTGC-BBQ
	G	FAM-AAAATCTTATCTGACGATGAAGTGC-BBQ
<i>gyrB</i> SNP1423	A	HEX-GATGAAGTGCGTACAATTACTG-BBQ
	G	FAM-GATGAAGTGCGTGCAATTACTG-BBQ
<i>parC</i> SNP242	C	HEX-CGCATGGTGATTCCYCTGTATATRA-BBQ
	T	FAM-CGCATGGTGATTTCYCTGTATATRA-BBQ
	A	FAM-CGCATGGTGATTACYCTGTATATRA-BBQ
<i>parC</i> SNP244	T	HEX-CACGGTGATTHCTCTGTATATRAAG-BBQ
	C	FAM-CACGGTGATTHCCCTGTATATRAAG-BBQ
<i>parC</i> SNP253	G	HEX-THCYCTGTATATGAGGCGATGGTAC-BBQ
	A	FAM-THC YCTGTATATAAGGCGATGGTAC-BBQ

R= A/G; V= A/C/G; Y= C/T; H= A/C/T; HEX= Hexachloro-6-carboxyfluorescein;
BBQ= BlueBerryQuencher; FAM= 5(6)-Carboxyfluorescein

2.3.4.1.3 Lösungen und PCR-Ansatz

Für jedes der acht Protokolle wurde ein *singleplex* PCR-Ansatz entwickelt. Für die meisten dieser PCRs konnte die in Tab. 13 dargestellte Zusammensetzung gewählt werden.

2 Material und Methoden

Tab. 13: allgemeiner PCR-Ansatz TaqMan

<i>Reagens</i>	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>µl/Reaktion</i>
ABI TaqMan 2x PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt		10,00
PCR-Wasser	5-Prime, Hamburg		5,00
Primer F	TibMolBiol, Berlin	0,5 µM	1,00
Primer R	TibMolBiol, Berlin	0,5 µM	1,00
HEX-Sonde Wildtyp (W)	TibMolBiol, Berlin	0,25 µM	0,50
FAM-Sonde Mutation (M)	TibMolBiol, Berlin	0,25 µM	0,50
Proben-DNA			2,00

2.3.4.1.4 Thermoprofil

Die Durchführung der TaqMan-PCR erfolgte im MX 3000-Cycler (Stratagene, Santa Clara, USA).

Tab. 14: Thermoprofil für jeden singleplex TaqMan PCR-Ansatz

<i>Parameter</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Messung Fluoreszenz</i>
Aktivierung der Fast Start Taq DNA polymerase	95 °C	15:00 min	keine
Amplifikation (40 Zyklen)	95	45 s	keine
	55 bzw. 60	45 s	am Ende
	72	45 s	keine

Für die beiden Protokolle der SNPs *gyrA* SNP266 A>C/G und *gyrB* SNP1423 A>G wurde eine Annealingtemperatur von 60 °C eingestellt. Die restlichen sechs Protokolle besaßen eine Annealingtemperatur von 55 °C.

2 Material und Methoden

2.3.4.1.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch das Softwareprogramm des Gerätes MX 3000 (Stratagene, Santa Clara, USA). Während jedes Zyklus wurden die Fluoreszenzstärken der Donor-Fluorophore gemessen. So entstand am Ende einer PCR ein Diagramm, welches den Verlauf der gemessenen Fluoreszenzwerte der Donore während aller Zyklen zueinander darstellte. Durch den Kurvenverlauf und die Ct-Werte konnte eine eindeutige Zuordnung der vorhandenen Base an der SNP-Stelle der Proben-DNA erfolgen.

2.3.4.2 Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (= MeltMAMA; nach Birdsell et al., 2012 (42))

Das Prinzip des MeltMAMA beruht auf der Zugabe von zwei verschiedenen *Forward* Primern zu einem *Reverse* Primer und der Auswertung durch die Messung der Schmelztemperatur der gebildeten Amplifikate. Die *Forward* Primer unterscheiden sich zum einen in der Base am 3'-Ende. An dieser Position befindet sich die nachzuweisende SNP-Base, sodass sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutation jeweils ein *Forward*-Primer benötigt wird. Zusätzlich ist die drittletzte Base vom 3'-Ende beider *Forward* Primer nicht komplementär zur Proben-DNA. Dadurch hat der passende *Forward* Primer nur einen sogenannten *mismatch* (= ein nicht komplementäres Basenpaar zwischen Primer und Proben-DNA) und bindet trotzdem an die Proben-DNA. Der nicht passende *Forward* Primer hingegen besitzt folglich zwei *mismatches* und zeigt dadurch ein deutlich schlechteres Bindungsvermögen an die Proben-DNA. Zusätzlich wurde an dem 5'-Ende des Mutations *Forward* Primers ein *GC-clamp* (Sequenz GGGCGGGCGGGCGGGCGGGC) angehängt. Durch diesen *GC-clamp* liegt die Schmelztemperatur der Amplifikate dieses Primers ca. 4 °C höher als die der Amplifikate des anderen Primers. Die Messung der Schmelztemperatur erfolgt durch die Fluoreszenzmessung des zugegebenen SYBR-Greens während einer kontinuierlichen

2 Material und Methoden

Aufschmelzung des DNA-Doppelstranges, da SYBR-*Green* unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und nur während dieser Bindung fluoresziert (20).

Es wurde ein MeltMAMA-Protokoll hergestellt. Dieses Protokoll weist den CIP-Resistenz verursachenden SNP *gyrA* SNP254 C>T nach.

2.3.4.2.1 Proben

Es wurden der *B. cereus* Wildtyp, eine Auswahl der *B. cereus* Mutanten und der *B. anthracis* Stämme, welche in Tab. 2 aufgelistet sind, sowie künstliche Templates, welche in Tab. 3 verzeichnet sind, untersucht.

2.3.4.2.2 Primer

Die Primer wurden unter Zuhilfenahme der Programme Primer3Plus (Bioinformatics, Boston, USA) und Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) erstellt und von TibMolBiol (Berlin) erworben.

Tab. 15: Für MeltMAMA-PCR verwendete Primer

SNP	Primername	Sequenz 5'-3'
<i>gyrA</i> 254 C>T	MM_gyrA254C_F	CATTCATAGTGGGAGTACCACTGAG
<i>gyrA</i> 254 C>T	MM_gyrA254T_F	GGGCGGGCGGGCGGGC- CATTCATAGTGGGAGTACCACTGAA
<i>gyrA</i> 254 C>T	MM_gyrA254_R	AATGGTACGGGTAGTTGTTTCGTA

2 Material und Methoden

2.3.4.2.3 Lösungen und PCR-Ansatz

Tab. 16: PCR-Ansatz für MeltMAMA-PCR

<i>Reagens</i>	<i>Firma</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>µl/Reaktion</i>
LC FastStart Sybr Green Mix 10x	Roche, Basel		2,00
LC PCR Wasser	Roche, Basel		13,475
MgCl ₂	Roche, Basel	3 mM	2,40
AM-Primer	TibMolBiol, Berlin	0,25 µM	0,50
DM-Primer	TibMolBiol, Berlin	0,0625 µM	0,125
rev-Primer	TibMolBiol, Berlin	0,25 µM	0,50
DNA-Probe			1,00

2.3.4.2.4 Thermoprofil

Die Durchführung des MeltMAMA erfolgte im Gerät LightCycler 2.0 (Roche, Basel).

Tab. 17: Thermoprofil für MeltMAMA *gyrA* SNP254 C>T

<i>Parameter</i>	<i>Temp [°C]</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Zeit h:min:s</i>	<i>Anstiegsrate (°C/s)</i>	<i>Messung</i>	<i>Fluoreszenz</i>
Aktivierung	95	1	00:10:00	20	keine	
Amplifikation	95	35	00:00:15	20	keine	Quantifikation
	60		00:00:20	20	keine	
	72		00:00:20	20	single	
Schmelzkurvenanalyse	95	1	00:00:00	20	keine keine kontinuierlich	Schmelzkurve
	60		00:00:30	20		
	95		00:00:00	0,2		
Abkühlung	40	1	00:00:30	20	keine	

2 Material und Methoden

2.3.4.2.5 Auswertung

Die Auswertung wurde von dem zum LightCycler 2.0 (Roche, Basel) gehörenden Softwareprogramm durchgeführt. Sie erfolgte durch die Erstellung von Schmelzkurven mit einem Maximum (Peak) in der Schmelztemperatur des entstandenen Amplifikates. Je nach Lage des Maximums konnte die SNP-Base dem Wildtyp oder der resistenten Mutante zugeordnet werden.

2.3.5 Quantitative Real-Time-PCR

2.3.5.1 *B. anthracis gyrA* Plasmid PCR

Mithilfe dieser PCR erfolgte eine Quantifizierung der vorhandenen Menge der eingesetzten Proben-DNA. Dies geschieht durch den Vergleich der Ct-Werte des *gyrA* Kontroll-Plasmid-Standards (TibMolBiol, Berlin), dessen Konzentration bekannt ist, mit den Ct-Werten der Proben-DNA.

2.3.5.1.1 Proben

Es wurden der *B. cereus* Wildtyp, eine Auswahl der *B. cereus* Mutanten und der *B. anthracis* Stämme, welche in Tab. 2 aufgelistet sind, verwendet.

2.3.5.1.2 Primer und Sonde

Die für die *gyrA* Plasmid PCR benötigten Primer und die Sonde sind in Tab. 18 aufgeführt. Die Herstellung erfolgte durch die Firma TibMolBiol (Berlin).

2 Material und Methoden

Tab. 18: Primer und Sonde für *B. anthracis gyrA* PCR

Primername	Sequenz 5'-3'
Ba-gyrA-1-F	ATGTCAGACAATCAASAACAAGC
Ba-gyrA-100-R	CGAGAYACGATAACACTCATTGC
Ba-gyrA-41-PS	FAM-TATTAGYCATGAAATGCGTACCTC-BBQ

Y= C/T; BBQ= BlueBerryQuencher; FAM= 5(6)-Carboxyfluorescein; S=G/C

2.3.5.1.3 Lösungen und PCR-Ansatz

Tab. 19: PCR-Ansatz für die *B. anthracis gyrA* Plasmid PCR

Reagens	Firma	Endkonzentration	µl/Reaktion
LC FastStart DNA Master Hybridization Probes 10x	Roche, Basel		2,00
MgCl ₂	Roche, Basel	4 mM	3,20
LC PCR Wasser	Roche, Basel		10,30
Ba-gyrA-1-F	TibMolBiol, Berlin	0,5 µM	1,00
Ba-gyrA-100-R	TibMolBiol, Berlin	0,5 µM	1,00
Ba-gyrA-41-PS	TibMolBiol, Berlin	0,25 µM	0,50
DNA-Probe			2,00

2.3.5.1.4 Thermoprofil

Die Durchführung der PCR erfolgte am Gerät LightCycler 2.0 (Roche, Basel).

Tab. 20: Thermoprofil für *B. anthracis gyrA* Plasmid PCR

Parameter	Temperatur °C	Zeit	Messung Fluoreszenz
Aktivierung	95	15:00 min	keine
Amplifikation (45 Zyklen)	95	45 s	keine
	55	45 s	am Ende
	72	45 s	keine
Abkühlung	40	30 s	keine

2 Material und Methoden

2.3.5.1.5 Auswertung

Die Auswertung wurde von dem zum LightCycler 2.0 (Roche, Basel) gehörenden Softwareprogramm durchgeführt. Durch die Vorgabe der Konzentration der *gyrA* Kontroll-Plasmid-Verdünnungen wurde eine Standardkurve errechnet und anhand dieser die Konzentrationen der Proben-DNA bestimmt.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Ciprofloxacin-resistente *B. cereus* Mutanten

3.1.1 Generierung der Mutanten

Der Wildtyp des *B. cereus* Stammes ATCC10987 zeigte eine minimale Hemmstoffkonzentration von 0,125 µg/ml im Gradientendiffusionstest sowie im Mikrodilutionstest (siehe Abb. 7 und Abb. 8) und konnte so als empfindlich gegen Ciprofloxacin definiert werden (43).

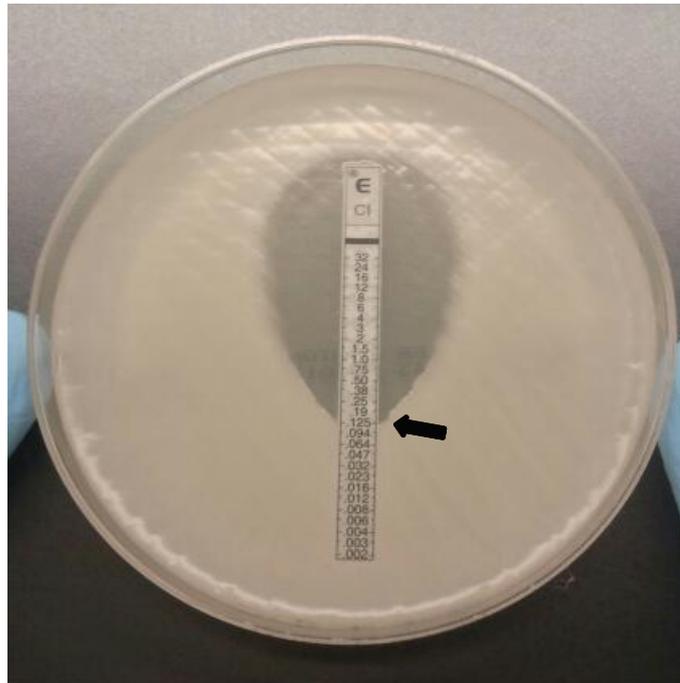


Abb. 7: *B. cereus* ATCC10987 Wildtyp mit MHK-Wert 0,125 µg/ml CIP, Gradientendiffusionstest. Der Pfeil deutet auf die Schnittstelle der ellipsoiden Wachstumsgrenze mit dem antibiotikahaltigen Streifen, an welcher der MHK-Wert von 0,125 µg/ml abgelesen werden kann.

3 Ergebnisse

Wert für CIP liegt bei 0,125 µg/ml.

Durch die wiederholte Anzucht auf verschiedenen konzentrierten CIP-MHII-Agar konnten neun verschiedene Reihen von *B. cereus* CIP-Mutanten parallel generiert werden (siehe Tab. 21).

Die Entstehung der einzelnen Reihen erfolgte in drei zeitlich voneinander getrennten Durchläufen. Die erste Ziffer in dem Namen jeder erzeugten Mutante bezeichnet den Durchlauf, in welchem diese Mutante entstanden ist. In den ersten beiden Durchläufen wurden zu Anfang fünf *B. cereus* Kolonien und in dem dritten Durchlauf zwei *B. cereus* Kolonien gepickt, diese wurden wiederum durchnummeriert und ergeben die zweite Ziffer in dem Namen jeder Mutante. Die Reihen 1.1, 1.2 und 2.5 zeigten innerhalb der zweiten oder dritten Anzucht kein Kolonienwachstum mehr, sodass sie nicht weiter verfolgt werden konnten. Sechs Mutanten erreichten einen maximalen MHK-Wert von > 16 µg/ml, welcher auch durch wiederholte Anzüchtungen nicht erhöht werden konnte. Die restlichen drei Mutanten besaßen einen finalen MHK-Wert von > 256 µg/ml.

Tab. 21: Auflistung generierter Reihen an *B. cereus* CIP-Mutanten und MHK-Werte (*CIP in Festmedium)

<i>Name der Mutante</i>	<i>MHK-Wert*</i>
1.3	> 256 µg/ml
1.4	> 16 µg/ml
1.5	> 16 µg/ml
2.1	> 16 µg/ml
2.2	> 256 µg/ml
2.3	> 256 µg/ml
2.4	> 16 µg/ml
3.1	> 16 µg/ml
3.2	> 16 µg/ml

3 Ergebnisse

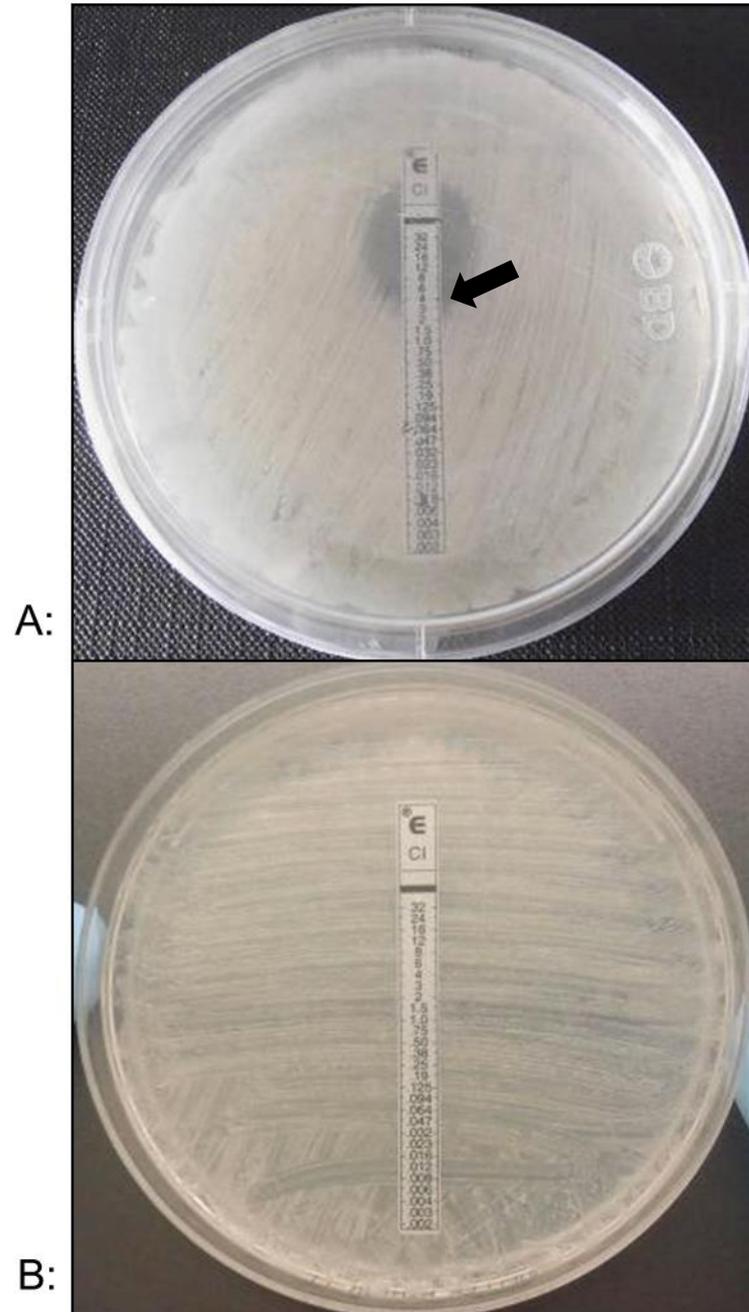


Abb. 9: Gradientendiffusionstests während Generierung der *B. cereus* CIP-Mutante 1.3, A: Mutante 1.3.4 MHK-Wert 3,5 µg/ml, B: Mutante 1.3.10 MHK-Wert > 32 µg/ml. Der schwarze Pfeil deutet auf den MHK-Wert von A. Da B ein komplettes Wachstum der Agar-Platte aufweist, kann kein genauer MHK-Wert festgelegt werden. So besitzt die Mutante B einen MHK-Wert von > 32 µg/ml.

3.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der vier Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* aller *B.*

3 Ergebnisse

cereus CIP-Mutanten zeigten, dass nur die Mutante 1.3 einen *SNP* im Gen *gyrA* aufwies. Dieser *SNP* befand sich an der Stelle 254 im Gen *gyrA* und stellt einen Wechsel der Base Cytosin zur Base Thymin dar. Er trat auf ab einem MHK-Wert von über 2 µg/ml. Die Abb. 10 zeigt einen Abschnitt des Gens *gyrA*, inklusive der *SNP*-Stelle, des *B. cereus* ATCC10987 Wildtyps und des Mutanten 1.3. Die anderen Mutanten zeigten keine Änderungen in diesen vier Genen.

	220	230	240	250	260
Wildtyp	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTCA	GCCGTTTAT
0,5 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTCA	GCCGTTTAT
1 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTCA	GCCGTTTAT
2 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
4 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
8 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
16 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
32 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
64 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
128 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT
256 µg/ml	GAAGTA	ATCGGTAAGT	ATCACCTCA	TGGTGATTTA	GCCGTTTAT

Abb. 10: Ausschnitt Gen *gyrA* des *B. cereus* Wildtypes und der Mutante 1.3. Dargestellt wird der Abschnitt vom 220. bp bis zum 264. bp des Gens *gyrA*. Der Name Wildtyp steht für den *B. cereus* WT. Die anderen Titel bezeichnen den jeweiligen MHK-Wert des sequenzierten Entwicklungsschrittes der *B. cereus* Mutante 1.3. Die Base am 254. bp des Gens *gyrA*, welche in Rot dargestellt wird, ist der mögliche *SNP*. Der Wildtyp und die beiden Entwicklungsschritte mit den niedrigsten MHK-Werten besitzen ein Cytosin (= C) und somit die Wildtyp-Base. Ab einem MHK-Wert von 2 µg/ml besitzt diese Mutationsreihe die Mutations-Base Thymin (= T).

3.2 Nalidixinsäure-resistente *B. cereus* Mutanten

3.2.1 Generierung der Mutanten

Für den *B. cereus* ATCC10987 Wildtyp wurde eine minimale Hemmstoffkonzentration von 6 µg/ml ermittelt.

Mittels Anzucht auf NAL-MHII-Agar wurden drei NAL-resistente Mutanten generiert, die je einen MHK-Wert von > 320 µg/ml aufwiesen.

3 Ergebnisse

Tab. 22: Liste generierter *B. cereus* NAL-Mutanten und zugehöriger MHK-Werte (*NAL in Festmedium)

<i>Name Mutante</i>	<i>MHK-Wert*</i>
1.1 N	> 320 µg/ml
1.2 N	> 320 µg/ml
1.3 N	> 320 µg/ml

3.2.2 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der vier Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* der NAL-Mutanten zeigten zwei SNPs. Einer dieser SNPs entstand in der Mutante 1.1 N ab einem MHK-Wert von > 80 µg/ml. Er lag im Gen *gyrA* an der Stelle 254 und wies einen Basenwechsel von Cytosin zu Thymin auf. Dieser SNP entspricht dem SNP, welche in der CIP-Mutante 1.3 vorhanden ist (siehe Abb. 10). Die Mutante 1.2 N besaß den zweiten SNP (siehe Abb. 11) im Gen *gyrB* an der Stelle 1313. Hier kam es zu einer Änderung der Base Cytosin in ein Thymin. In der Mutante 1.3 N konnte kein SNP innerhalb der vier Gene nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

	1280	1290	1300	1310	1320
Wildtyp	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGCAA	AACAAGGAC
20 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGCAA	AAAAAGGAC
40 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGTAA	AACAAGGAC
80 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGTAA	AACAAGGAC
120 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGTAA	AACAAGGAC
160 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGTAA	AACAAGGAC
320 µg/ml	ACATCG	TAGAGGGTGA	CTCTGCGGGT	GGATCTGTAA	AACAAGGAC

Abb. 11: Ausschnitt Gen *gyrB* des *B. cereus* Wildtyps und der Mutante 1.2 N. Dargestellt wird der Abschnitt vom 1280. bp bis zum 1324. bp des Gens *gyrB* des Wildtyps und der einzelnen Entstehungsschritte der Mutante 1.2 N. An der Stelle 1313 befindet sich der mögliche SNP, welcher in Rot dargestellt wird. Die Wildtyp-Base Cytosin (= C) besitzen der Wildtyp sowie der Entwicklungsschritt mit dem niedrigsten MHK-Wert. Die restliche Reihe der Mutante 1.2 N besitzt die Mutations-Base Thymin (= T).

3.3 Kreuzresistenz der *B. cereus* Mutanten

Die generierten *B. cereus* CIP-Mutanten und NAL-Mutanten wurden jeweils mittels eines Gradientendiffusionstests auf ihre Empfindlichkeit gegen Nalidixinsäure bzw. Ciprofloxacin getestet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 23 gelistet. So zeigte sich, dass sämtliche Mutanten einen erhöhten MHK-Wert gegen jenes Fluorochinolon aufwiesen, gegen welches sie nicht resistent gemacht wurden. Es entstanden für die CIP-Mutanten MHK-Werte, welche sie als hoch resistent gegen NAL kennzeichnen. Die NAL-Mutanten hingegen zeigten MHK-Werte, die weiterhin im empfindlichen Bereich für CIP liegen.

3 Ergebnisse

Tab. 23: Liste *B. cereus* Mutanten und zugehöriger CIP- sowie NAL-MHK-Werte laut Gradientendiffusionstest (maximal ablesbare MHK-Werte CIP 32 µg/ml, NAL 256 µg/ml)

<i>Name Mutante</i>	<i>MHK-Wert CIP</i>	<i>MHK-Wert NAL</i>
1.3	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
1.4	> 32 µg/ml	24 µg/ml
1.5	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
2.1	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
2.2	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
2.3	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
2.4	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
3.1	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
3.2	> 32 µg/ml	> 256 µg/ml
1.1 N	0,38 µg/ml	> 256 µg/ml
1.2 N	0,5 µg/ml	> 256 µg/ml
1.3 N	0,5 µg/ml	> 256 µg/ml

3.4 MHK-Wert Bestimmung verschiedener *B. cereus* Stämme

Es wurden Mikrodilutionstests von 93 *B. cereus* Stämmen des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU München (siehe Tab. 2) insbesondere hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber CIP durchgeführt. So konnte man einen Einblick in das allgemeine Verhalten verschiedenster *B. cereus* Stämme gegenüber CIP gewinnen. Die Tests ergaben keine außergewöhnlichen Spektren von MHK-Werten. Die minimalen Hemmstoffkonzentrationen gegenüber CIP lagen alle zwischen 0,063 µg/ml und 0,5 µg/ml. Die Spannweite der MHK-Werte sind in der Abb. 12 dargestellt. Alle diese *B. cereus* Stämme sind als CIP-sensitiv zu bezeichnen.

3 Ergebnisse

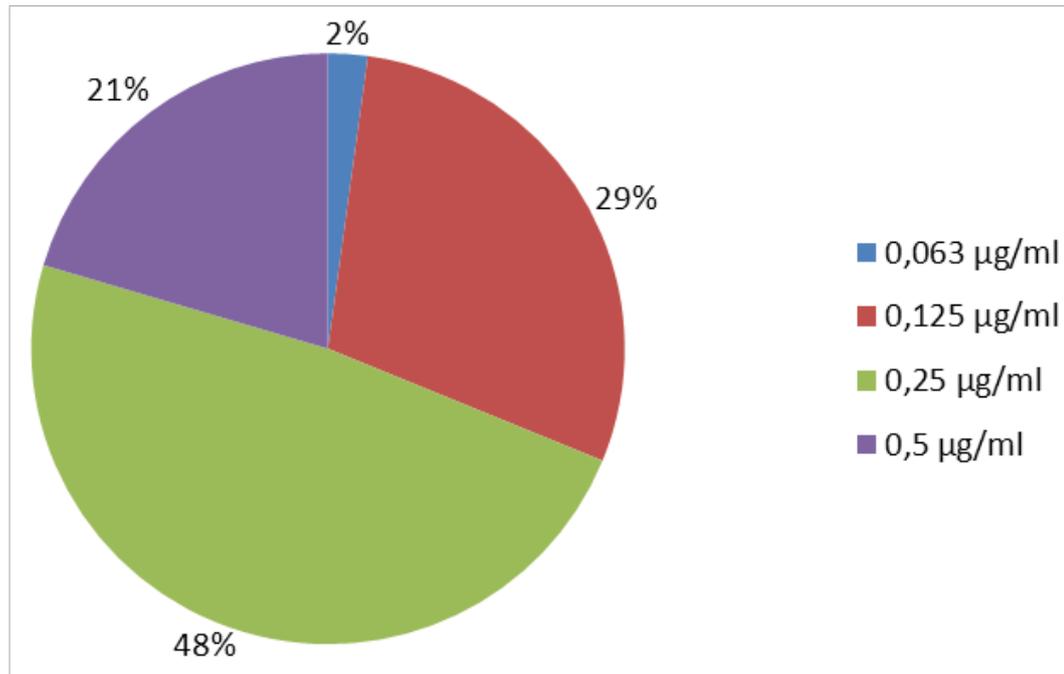


Abb. 12: Darstellung der MHK-Werte für CIP der 93 untersuchten *B. cereus* Stämme. 48 % der Stämme zeigten einen MHK-Wert von 0,25 µg/ml. 29 % besaßen den nächstniedrigen MHK-Wert von 0,125 µg/ml und weitere 21 % den nächsthöheren MHK-Wert von 0,5 µg/ml. 2 % der Stämme hatten einen weit niedrigeren MHK-Wert von 0,063 µg/ml.

Im Rahmen der Untersuchung konnte weiterhin festgestellt werden, dass sämtliche *B. cereus* Stämme resistent gegen Penicillin reagierten (Daten nicht gezeigt).

3.5 MeltMAMA Assay

Es wurde ein Protokoll zum Nachweis des SNPs *gyrA* SNP254 C>T (MM_gyrA254) entwickelt.

Für die Probeläufe wurden verschiedene *B. anthracis* Stämme, der *B. cereus* WT und resistente *B. cereus* Mutanten (siehe Tab. 2) als Proben genutzt. Hierbei konnte erkannt werden, dass dieses Protokoll nicht für *B. anthracis* Stämme anwendbar war, da diese Proben während der PCR nicht amplifiziert werden konnten.

Versuche, auch für andere SNPs und besonders für *B. anthracis* funktionierende Protokolle zu entwickeln, scheiterten. Für drei weitere SNPs, welche im Gen *parC* liegen, wurden diese Versuche durchgeführt.

3 Ergebnisse

Hierbei konnte auch die Variation der PCR-Parameter, zum Beispiel eine Erhöhung der Annealingtemperatur oder die Veränderung des MgCl₂-Gehaltes im Mastermix keine Verbesserung erzielen. Auch eine Neusynthese der Primer brachte nicht den gewünschten Erfolg. Gründe dafür waren unter anderem zu nah beieinanderliegende SNPs, sodass die Vorwärtsprimer durch nicht komplementäre einzelne Basen nicht an die Proben-DNA binden konnten und zu große entstehende Amplifikate, durch welche die Schmelztemperaturen der Amplifikate von Positiv- und Negativproben auf gleicher Höhe lagen. Aufgrund der nicht überwindbaren Problematik wurde nur dieses eine MeltMAMA Protokoll hergestellt und die Entwicklung des Schnelltestes fortan auf TaqMan-Methode weiterentwickelt.

3.5.1 Protokoll: MM_gyrA254

Der PCR-Ansatz und das Thermoprofil mit einer Annealingtemperatur von 60 °C, siehe Tab. 16 und Tab. 17, wurden für das Protokoll verwendet.

Die Auswertung der PCR erfolgte über die Schmelzkurven und die Lage der Schmelztemperaturen der Amplifikate, wie in Kapitel 3.5.2.5. bereits beschrieben. Abb. 13 und Tab. 24 zeigen die typischen Schmelzkurven und Schmelztemperaturen für MM_gyrA254. Die Wildtypkontrolle *B. cereus* Mutante 1.4 besitzt eine Schmelztemperatur von 79,3 °C. Die der Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 liegt bei 82,7 °C. Der um ca. 3 °C höher liegende Peak der Mutationskontrolle zeigt, dass diese durch den Mutations Forward Primer amplifiziert wurde, welcher den GC-clamp und die Mutationsbase besitzt. Die Wasserkontrolle besitzt, da sie nicht amplifiziert wird, einen flachen Kurvenverlauf.

3 Ergebnisse

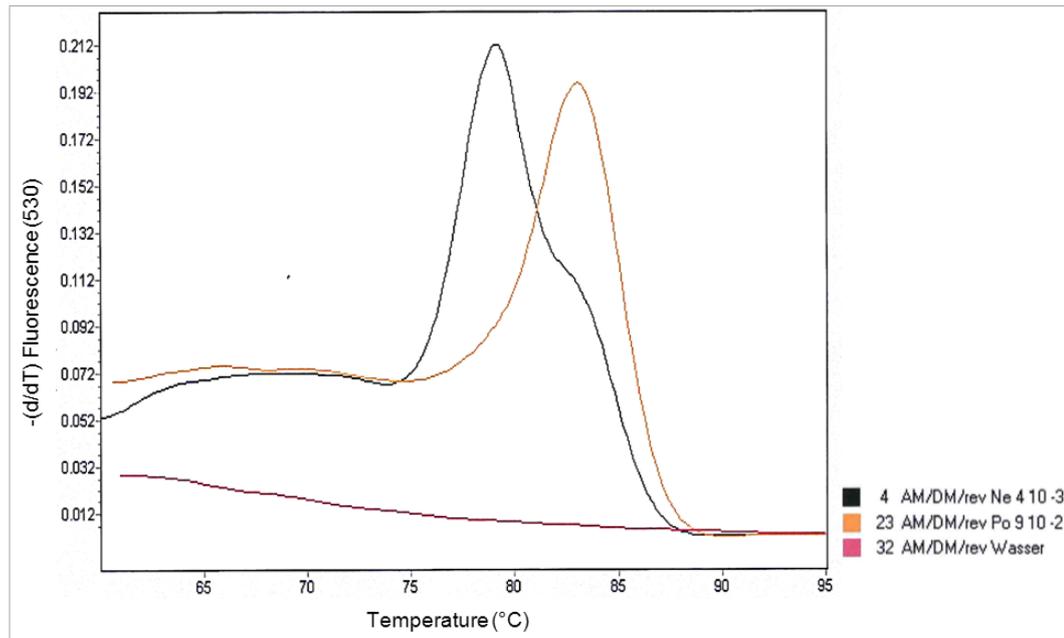


Abb. 13: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 mit Negativ- und Mutationskontrolle. Dargestellt sind die Wildtypkontrolle *B. cereus* Mutante 1.4 Ne 4 10⁻³ (schwarz), die Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 Po 9 10⁻² (orange) und die Wasserkontrolle (pink). Die Maxima (= Peaks) der Negativ- und Mutationskontrolle bezeichnen deren jeweilige Schmelztemperaturen. So besitzt Ne 4 10⁻³ (schwarz) den Peak bei ca. 79°C und Po 9 10⁻² (orange) bei ca. 83 °C. Die Wasserkontrolle besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

Tab. 24: Schmelztemperaturen Negativ- und Mutationskontrolle
(Bestimmung der Konzentration der Proben-DNA durch *gyrA* Plasmid real-time-PCR)

Probe	Konzentration in Kopien/μl	Ct-Wert	Schmelztemp. 1 in °C	Schmelztemp. 2 in °C
Wildtypkontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.4	2 x 10 ³	28,98	79,3	-
Mutationskontrolle <i>B. cereus</i> Mutante 1.3	1 x 10 ⁵	28,92	-	82,7
Wasser	-	-	-	-

3.5.2 Sensitivität und Spezifität

Durch die Durchläufe mit Verdünnungsreihen verschiedener

3 Ergebnisse

Wildtypkontrollen, wie in Abb. 14 für die Probe *B. cereus* Mutante 1.4 dargestellt, konnte festgestellt werden, dass Proben, welche einen Ct von etwa 28 erzielten, die besten Ergebnisse aufwiesen. Diese Proben besaßen eine Konzentration von etwa 10^3 Kopien/ μ l. In der Abb. 14 wird die optimale Probe mittels einer schwarzen Kurve dargestellt. Höher konzentrierte Proben zeigten jeweils beide mögliche Schmelztemperaturen, wobei diejenige für die Mutation eine geringere Höhe besaß und nicht als einzelner Peak sondern als leichte Ausbuchtung der Schmelzkurve bei dieser Temperatur ausgebildet wurde. Somit konnte die Mutation in der Auswertung trotz der Entstehung beider möglicher Schmelztemperaturen ausgeschlossen werden. In der Abb. 14 sind dies die blaue, grüne und rote Kurve. Proben mit einer geringeren Konzentration als 10^3 Kopien/ μ l erzielten nur einen Peak für die richtige Schmelztemperatur. Jedoch war die Höhe dieses Peaks umso geringer je niedriger die Konzentration der eingesetzten Probe war. Abb. 14 weist eine rosa Kurve auf, welche eine Probe mit einer Konzentration von etwa 10^2 Kopien/ μ l darstellt. Die minimal einzusetzende Konzentration einer Probe konnte auf 10^2 Kopien/ μ l festgelegt werden, da Proben mit geringeren Konzentrationen in der PCR nicht amplifiziert wurden.

3 Ergebnisse

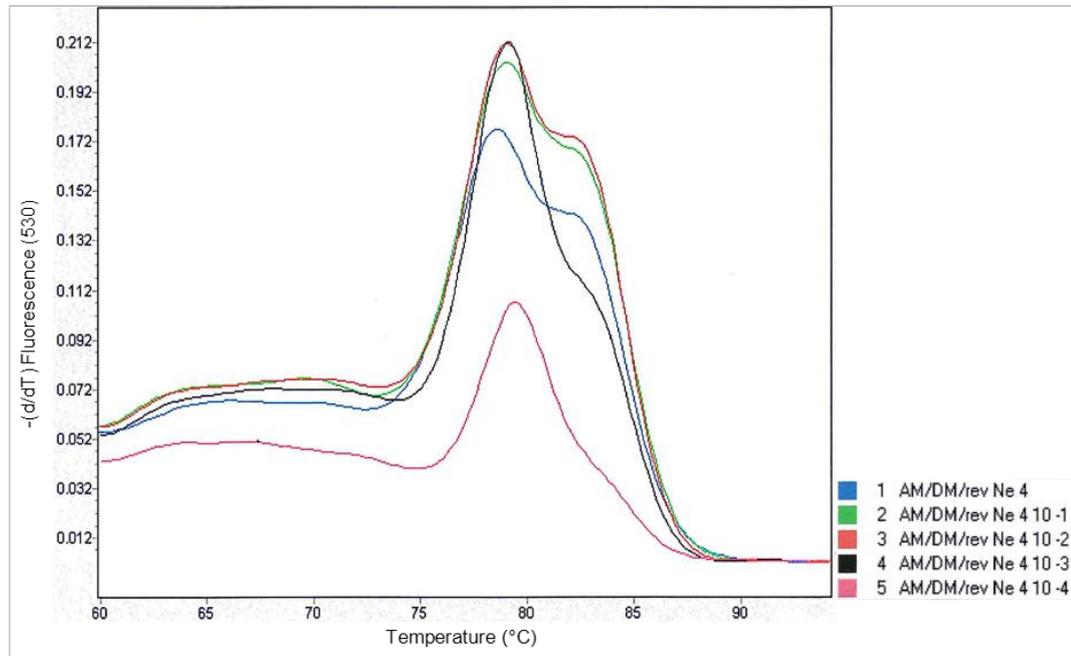


Abb. 14: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 der Wildtypkontrolle *B. cereus* Mutante 1.4 mit Verdünnungsreihe. Dargestellt sind die Kurvenverläufe verschiedener Verdünnungsstufen der *B. cereus* Mutante 1.4. Die Verdünnung erfolgte jeweils in einem Verhältnis von 1:10 von der unverdünnten Probe bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁴. Die Probe (blau) sowie die beiden ersten Verdünnungsstufen (grün und rot) besitzen einen Haupt- bei ca. 80 °C und einen kleineren Nebenpeak bei ca. 83 °C. Die beiden niedrigeren Verdünnungsstufen (schwarz und rosa) haben einen Peak bei ca. 80 °C. Bei der vierten Verdünnungsstufe (rosa) erreicht der Peak ca. die halbe Höhe der anderen Peaks.

3 Ergebnisse

Tab. 25: Schmelztemperaturen der Wildtypkontrolle *B. cereus* Mutante 1.4 in Verdünnungsreihe

Probe	Konzentration in Kopien/μl	Ct- Wert	Schmelztemp 1 in °C	Schmelztemp 2 in °C
<i>B. cereus</i> Mutante 1.4	2×10^6	21,41	79,2	82,6
<i>B. cereus</i> Mutante 1.4 10^{-1}	2×10^5	24,07	79,3	82,6
<i>B. cereus</i> Mutante 1.4 10^{-2}	2×10^4	26,35	79,3	82,5
<i>B. cereus</i> Mutante 1.4 10^{-3}	2×10^3	28,98	79,3	-
<i>B. cereus</i> Mutante 1.4 10^{-4}	2×10^2	> 30	79,6	-

Die Versuche mit verschiedenen Mutationskontrollen zeigten ein ähnliches Ergebnis wie diejenigen mit den Wildtypkontrollen. Als Beispiel dient hier die Probe *B. cereus* Mutante 1.3 aus der Abb. 15 und Tab. 26. Auch hier wiesen Proben mit einem Ct-Wert von etwa 28 die besten Ergebnisse auf, siehe orange Kurve aus Abb. 15. Jedoch besaßen diese Positivproben im Gegensatz zu den Wildtypkontrollen eine Konzentration von etwa 10^5 Kopien/ μ l. Bei einer höheren Konzentration der Proben entstanden wiederum Peaks für beide möglichen Schmelzpunkte. Eine eindeutige Einordnung zur Mutation war jedoch, wie oben beschrieben, problemlos möglich. Die Kurvenverläufe der hell- und dunkelblauen Proben aus Abb. 15 verdeutlichen dies. Wie die rote und violette Kurve der Abb. 15 zeigen, war die Auswertung mit weniger als 10^5 Kopien/ μ l konzentrierter Proben durch Peaks einer niedrigeren Höhe gekennzeichnet. Wie bei den Wildtypkontrollen konnte für die Mutationskontrollen die minimale Konzentration einer Probe auf 10^2 Kopien/ μ l festgelegt werden.

3 Ergebnisse

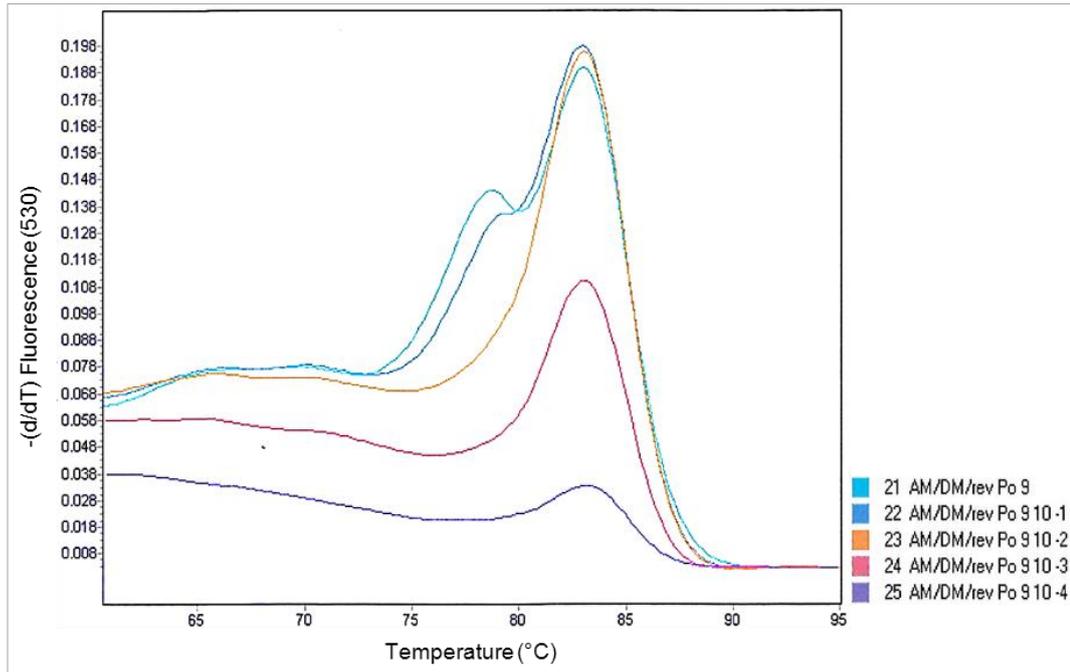


Abb. 15: Schmelzkurvenanalyse MM_gyrA254 der Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 mit Verdünnungsreihe. Dargestellt sind die Kurvenverläufe einer Verdünnungsreihe der *B. cereus* Mutante 1.3. Die Verdünnung erfolgte jeweils in einem Verhältnis 1:10. Die Probe (hellblau) und die erste Verdünnungsstufe (dunkelblau) sind durch 2 Peaks, einen Haupt- bei ca. 83°C und einen Nebenpeak bei ca. 79°C, gekennzeichnet. Die restlichen Verdünnungsstufen besitzen einen Peak bei ca. 83°C, der mit höherer Probenverdünnung niedriger wird.

Tab. 26: Schmelztemperaturen der Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 in Verdünnungsreihe

<i>Probe</i>	<i>Konzentration in Kopien/μl</i>	<i>Ct-Wert</i>	<i>Schmelztemp. 1 in °C</i>	<i>Schmelztemp. 2 in °C</i>
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3	1 x 10 ⁷	22,71	79,1	82,7
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3 10 ⁻¹	1 x 10 ⁶	25,37	79,2	82,7
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3 10 ⁻²	1 x 10 ⁵	28,92	-	82,7
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3 10 ⁻³	1 x 10 ⁴	> 30	-	82,7
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3 10 ⁻⁴	1 x 10 ³	> 30	-	82,8

3 Ergebnisse

3.6 TaqMan Assays

Es wurden acht verschiedene TaqMan-Protokolle entwickelt. Sie wiesen jeweils einen CIP-Resistenz verursachenden SNP nach.

Tab. 27: Liste der TaqMan-Protokolle und der zugehörigen SNPs

Protokollname	SNP
TM_gyrA254	<i>gyrA254</i> C>T
TM_gyrA265	<i>gyrA265</i> G>A
TM_gyrA266	<i>gyrA266</i> A>C/G
TM_gyrB1408	<i>gyrB1408</i> A>G
TM_gyrB1423	<i>gyrB1423</i> A>G
TM_parC242	<i>parC242</i> C>T/A
TM_parC244	<i>parC244</i> T>C
TM_parC253	<i>parC253</i> G>A

Während der Probeläufe jedes Protokolls wurden verschiedene *B. anthracis* Stämme, der *B. cereus* WT und resistente *B. cereus* Mutanten (siehe Tab. 2) sowie die passenden synthetischen Templates (siehe Tab. 3) als Proben genutzt. In den folgenden Abbildungen der TaqMan Assays wird jeweils nur eine Auswahl der getesteten Proben dargestellt, um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Es wurden diverse Parameter, wie die Annealingtemperatur oder das Verhältnis der Sonden zueinander, variiert, bis optimale Ergebnisse vorlagen bzw. keine weiteren Verbesserungen der Ergebnisse erzielt werden konnten.

Das Thermoprofil mit einer Annealingtemperatur von 55 °C, Tab. 14, wurde für sechs der acht TaqMan-Protokolle verwendet. Für die beiden PCRs TM_gyrA266 und TM_gyrB1423 wurde jedoch eine erhöhte Annealingtemperatur von 60 °C verwendet. Der PCR-Ansatz (siehe Tab. 13) variierte je nach Protokoll und SNP. Für einige der singleplex PCR-Ansätze musste das Verhältnis zwischen den zugegebenen Sonden verändert werden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Diese sind in Tab. 28 aufgeführt. Um weiterhin ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz zu

3 Ergebnisse

erhalten, wurde die entstandene Differenz, welche durch die Minimierung der zugegebenen Menge einer der Sonden entstand, durch PCR-Wasser ersetzt.

Tab. 28: Sondenverhältnis der TaqMan PCR-Ansätze (* zweite mögliche Mutationsbase)

SNP	Verhältnis Sonden W : M1 (:M2*)
<i>gyrA</i> SNP254 C>T	5 : 1
<i>gyrA</i> SNP265 G>A	1 : 2
<i>gyrA</i> SNP266 A>C/G	2 : 1 : 1
<i>gyrB</i> SNP1408 A>G	4 : 1
<i>gyrB</i> SNP1423 A>G	1 : 1
<i>parC</i> SNP242 C>T/A	8 : 1 : 1
<i>parC</i> SNP244 T>C	2 : 1
<i>parC</i> SNP253 G>A	1 : 1

Die Auswertung der PCR erfolgte, wie in Kapitel 3.5.1.5. bereits beschrieben, mittels eines Diagrammes, welches die Anzahl der Zyklen und die Höhe der gemessenen Fluoreszenzen der Sonden zueinander darstellt, oder mittels des Vergleiches der Ct-Werte.

3.6.1 Protokoll: TM_ *gyrA*254

In Abb. 16 wird der Verlauf der gemessenen Fluoreszenzwerte des Donors HEX, dessen Sonde die Wildtyp-Base enthält, während der PCR für jede Probe dargestellt. Die Wildtypkontrollen *B. anthracis* Stamm 3390 10^{-1} (türkis) und *B. cereus* WT 10^{-1} (rot) zeigen einen deutlichen Anstieg und sind somit als HEX-positiv zu bewerten. Der Kurvenverlauf der Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante Nr. 1.3 (hellgrün) hingegen ist flach und daher HEX-negativ. Auch die Wasserkontrolle (dunkelblau) besitzt einen flachen Kurvenverlauf. Abb. 17 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzwerte des zweiten Donors FAM der Sonde mit der Mutations-Base während der PCR. Hier verläuft die Kurve der Negativprobe *B. cereus* WT 10^{-1} (28) flach, sodass sie als FAM-negativ anzusehen sind. Einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz, und somit eine Zuordnung als FAM-

3 Ergebnisse

positiv, zeigt die Kurve der Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante Nr. 1.3 (hellgrün). Auch die Amplifikationskurve der zweiten Negativprobe *B. anthracis* 3390 10^{-1} steigt an und zeigt, dass auch die FAM-Sonde an die Probe anbinden kann. Jedoch beginnt der Anstieg circa drei Zyklen später als für das HEX und besitzt zugleich einen flacheren Verlauf als diese, wodurch die Zuordnung als HEX-positiv möglich wird. Wie auch in Abb. 16 ist der Kurvenverlauf der Wasserkontrolle (dunkelblau) flach.

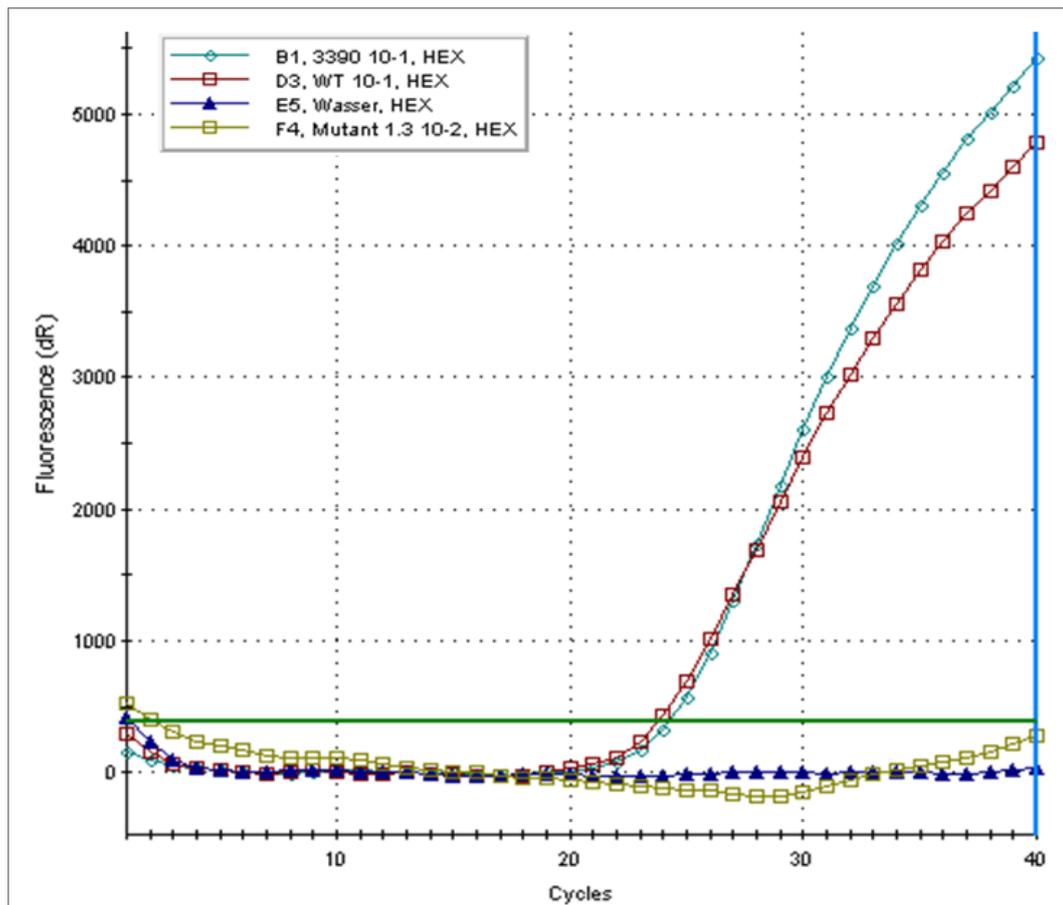


Abb. 16: Amplifikationskurven TM_gyrA254 HEX-Signal. Dargestellt werden die Amplifikationskurven der drei untersuchten Kontrollproben und der Wasserkontrolle. Der Threshold wird durch die grüne waagerechte Linie dargestellt. Die beiden Kurven, welchen einen Anstieg der Fluoreszenz vorweisen, sind als HEX-positiv zu definieren. Der Zyklus, in welchem diese Amplifikationskurven den Threshold kreuzen, wird als Ct-Wert definiert. Dies sind die beiden Wildtypkontrollen, der *B. cereus* WT in rot und der *B. anthracis* Stamm 3390 in türkis. Einen flachen Kurvenverlauf zeigt die Mutationskontrolle, die *B. cereus* Mutante 1.3 in grün. Sie ist somit HEX-negativ. Auch die Wasserkontrolle in blau besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

3 Ergebnisse

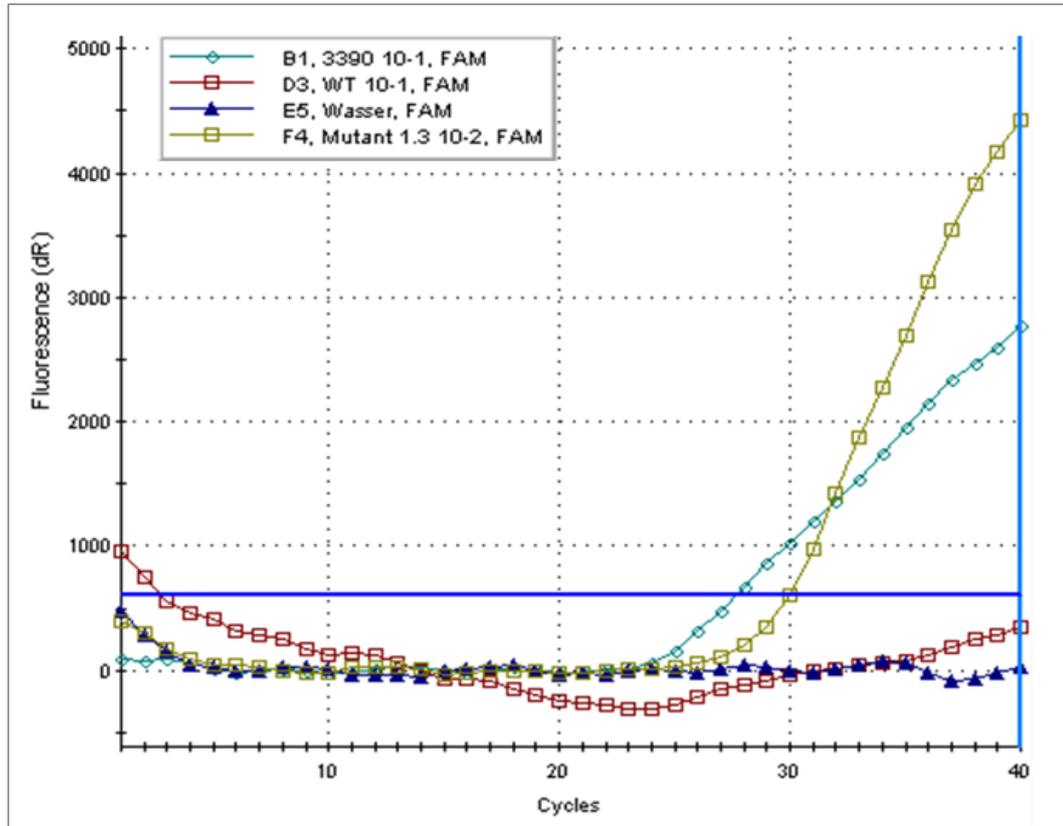


Abb. 17: Amplifikationskurven TM_gyrA254 FAM-Signal. Es sind vier Amplifikationskurven dargestellt. Der Threshold ist durch die blaue waagerechte Linie gekennzeichnet. Die Kurven für die Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 in grün und für die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 in türkis zeigen einen deutlichen Anstieg. Sie sind FAM-positiv. Die Kurve der zweiten Wildtypkontrolle *B. cereus* WT verläuft flach und ist FAM-negativ. Die Wasserkontrolle besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

Wie die Auswertung über die Amplifikationskurven ergeben auch die Ct-Werte, siehe Tab. 29, eindeutige Ergebnisse. So besitzt die Wildtypkontrolle *B. cereus* WT 10^{-1} nur den Ct-Wert für das HEX, die Mutationskontrolle *B. cereus* Mutante 1.3 10^{-2} hingegen einzig einen Ct-Wert für das FAM-Signal. Die zweite Wildtypkontrolle *B. anthracis* 3390 10^{-1} weist beide Ct-Werte und somit eine Anbindung beider Sonden auf. Jedoch ist die Zuordnung zum HEX-Signal zweifelsfrei möglich, da eine Differenz von > 3 zwischen dem kleineren HEX Ct-Wert und dem größeren FAM Ct-Wert besteht.

3 Ergebnisse

Tab. 29: Auswertung TM_gyrA254 über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> 3390 10 ⁻¹	24,26	27,67
<i>B. cereus</i> WT 10 ⁻¹	23,78	kein Ct
<i>B. cereus</i> Mutante 1.3 10 ⁻²	kein Ct	29,97
Wasser	kein Ct	kein Ct

3.6.2 Protokoll: TM_gyrA265

Die Auswertung des Protokolls TM-gyrA265 für den SNP *gyrA* SNP265 G>A erfolgte analog zu Kapitel 3.6.1.

Die Abb. 18 zeigt die Auswertung für die HEX-Sonde inklusive des HEX-positiven Ergebnisses für die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot). In der Abb. 19 werden die Ergebnisse der FAM-Sonde dargestellt. Als FAM-positiv ist hier nur das als Mutationskontrolle eingesetzte künstliche Template Po 10⁻⁵ (grün) zu bewerten.

3 Ergebnisse

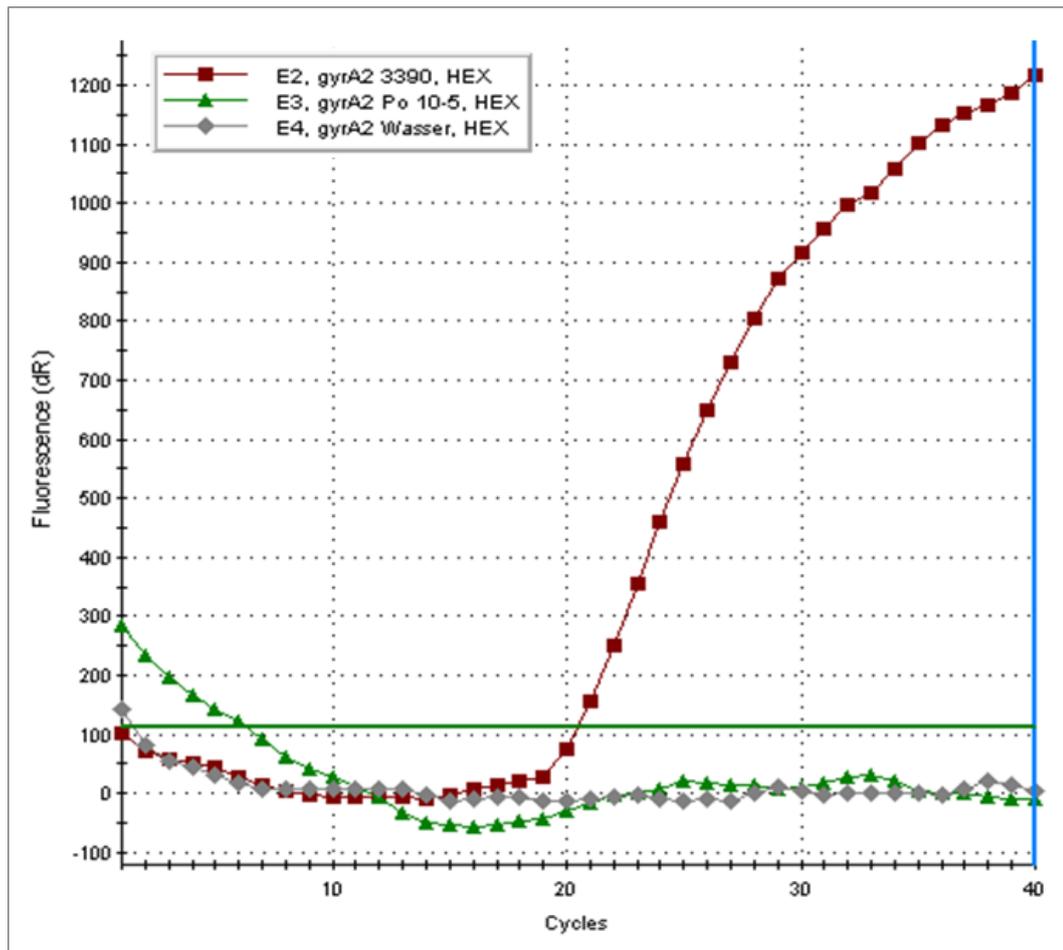


Abb. 18: Amplifikationskurven TM_gyrA265 HEX-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) ist HEX-positiv. Als HEX-negativ ist die Mutationskontrolle Po 10-5 (grün) anzusehen. Die Wasserkontrolle (grau) besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

3 Ergebnisse

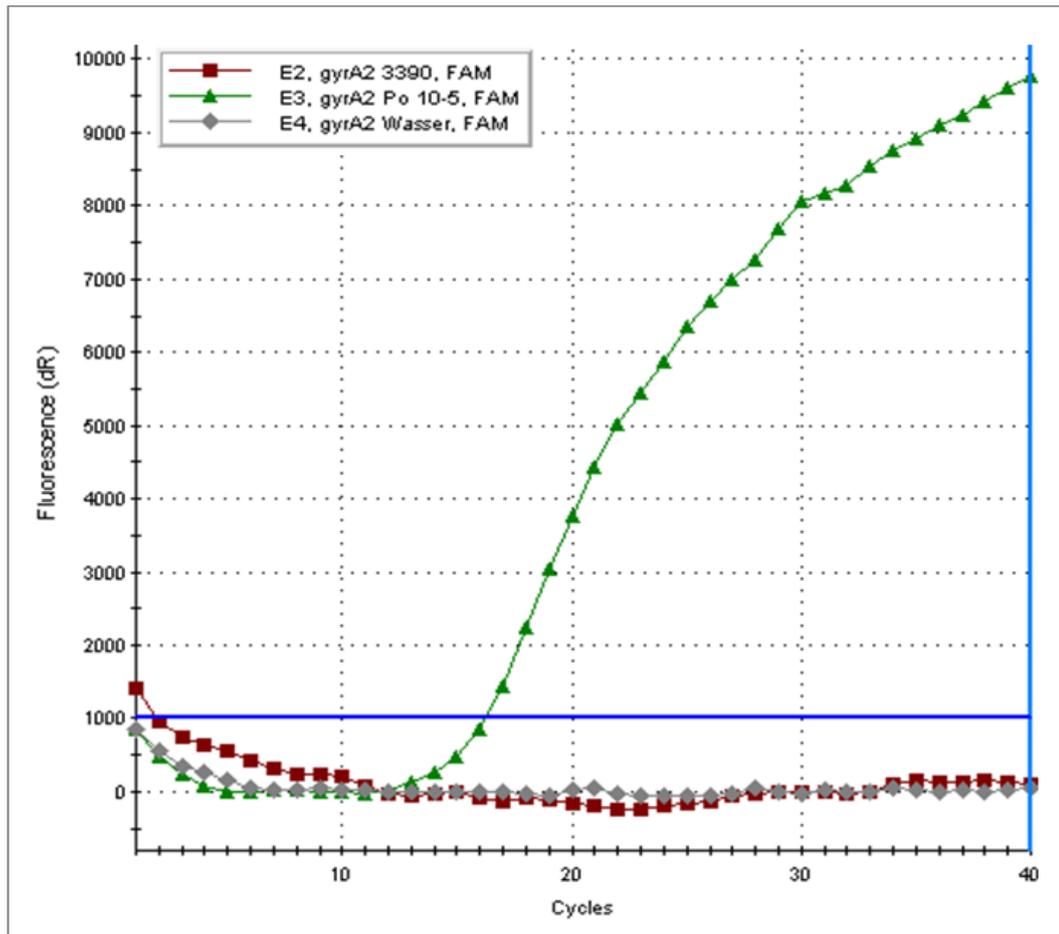


Abb. 19: Amplifikationskurven TM_gyrA265 FAM-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) ist FAM-negativ. Die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ (grün) hingegen ist FAM-positiv. Die Amplifikationskurve der Wasserkontrolle (grau) besitzt einen flachen Verlauf.

Die Tab. 30 verdeutlicht die Ergebnisse der beiden Abbildungen Abb. 18 und Abb. 19. So sind *B. anthracis* Stamm 3352 und *B. anthracis* Stamm 3390 HEX-positiv. Die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ hingegen wird als FAM-positiv definiert.

Tab. 30: Auswertung TM_gyrA265 über Ct-Werte

<i>Probe</i>	<i>Ct-Wert HEX</i>	<i>Ct-Wert FAM</i>
<i>B. anthracis</i> 3390	21,31	kein Ct
Po 10 ⁻⁵	kein Ct	16,21
Wasser	kein Ct	kein Ct

3 Ergebnisse

3.6.3 Protokoll: TM_gyrA266

Die Auswertung dieses Protokolls erfolgte wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

Der Unterschied bestand jedoch darin, dass zwei Mutationskontrollen eingesetzt wurden, da an dieser Wildtyp-Base im Gen *gyrA* eine Mutation in die beiden Basen Cytosin und Guanin möglich ist. Die Ergebnisse sind in den beiden Abbildungen Abb. 20 und Abb. 21 dargestellt. Diese zeigen die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau) als HEX-positiv und die beiden Mutationskontrollen Po1 10⁻⁵ (grün, Dreieck) und Po2 10⁻⁵ (orange) als FAM-positiv an.

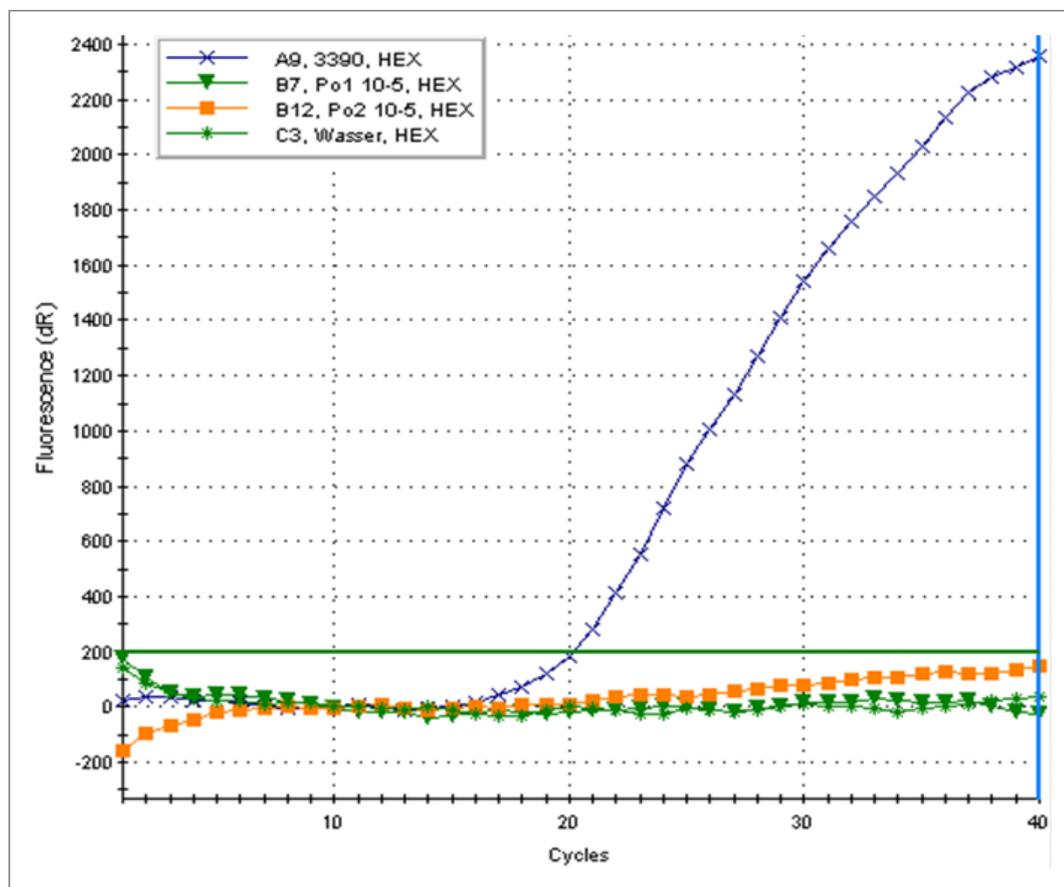


Abb. 20: Amplifikationskurve TM_gyrA266 HEX-Signal. Die eingesetzte Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau) ist HEX-positiv. Die beiden Mutationskontrollen Po1 10⁻⁵ (grün, Dreieck) und Po2 10⁻⁵ (orange), welche jeweils eine der beiden möglichen Mutations-Basen besitzen, können als HEX-negativ definiert werden. Die Wasserkontrolle (grün, Stern) besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

3 Ergebnisse

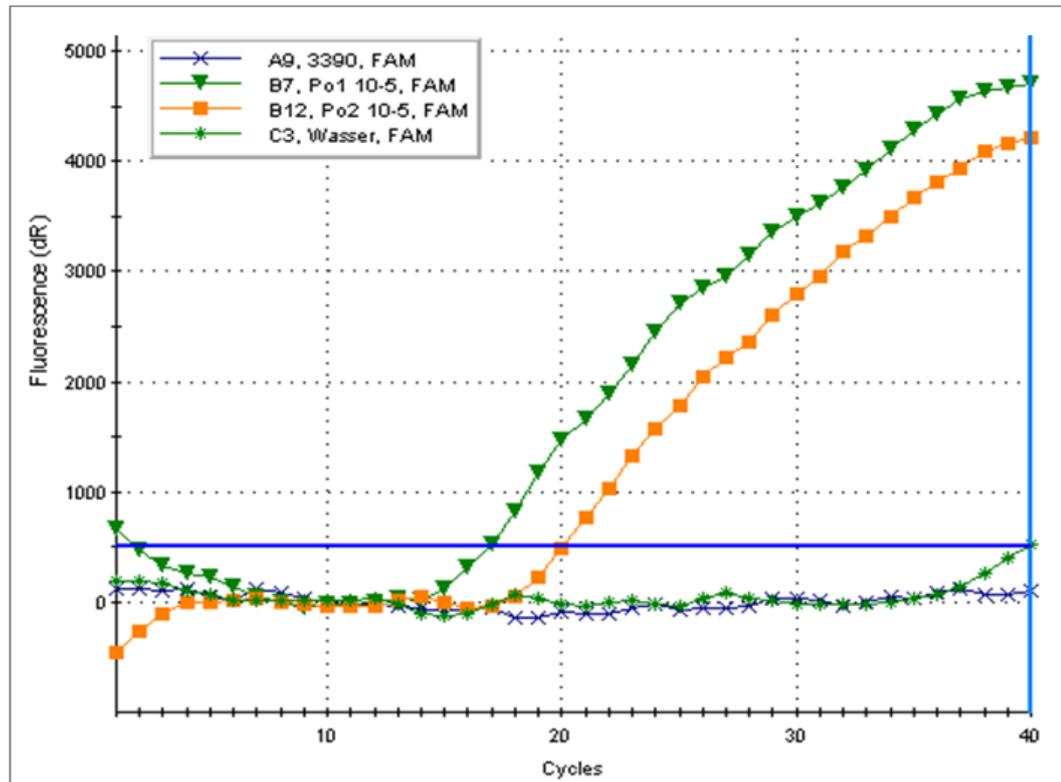


Abb. 21: Amplifikationskurve TM_gyrA266 FAM-Signal. FAM-negativ ist die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau, Kreuz). Die beiden Mutationskontrollen Po1 10^{-5} (grün, Dreieck) und Po2 10^{-5} (orange) hingegen sind FAM-positiv. Einen flachen Kurvenverlauf kennzeichnet die Wasserkontrolle (grün, Stern).

Die Ct-Werte legen eindeutige Ergebnisse, für die beiden Wildtypkontrollen *B. anthracis* Stamm 3352 und *B. anthracis* Stamm 3390 als HEX-positiv und die beiden Mutationskontrollen Po1 10^{-5} und Po2 10^{-5} als FAM-positiv, fest.

Tab. 31: Auswertung TM_gyrA266 über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> Stamm 3390	20,21	kein Ct
Po1 10^{-5}	kein Ct	16,9
Po2 10^{-5}	kein Ct	20,09
Wasser	kein Ct	kein Ct

3 Ergebnisse

3.6.4 Protokoll: TM_gyrB1408

Die Auswertung dieses Protokolls erfolgte wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

Die Abb. 22 zeigt, dass die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) HEX-positiv ist. In der Abb. 23 ist die FAM-positive Mutationskontrolle Po 10^{-5} (grün) dargestellt.

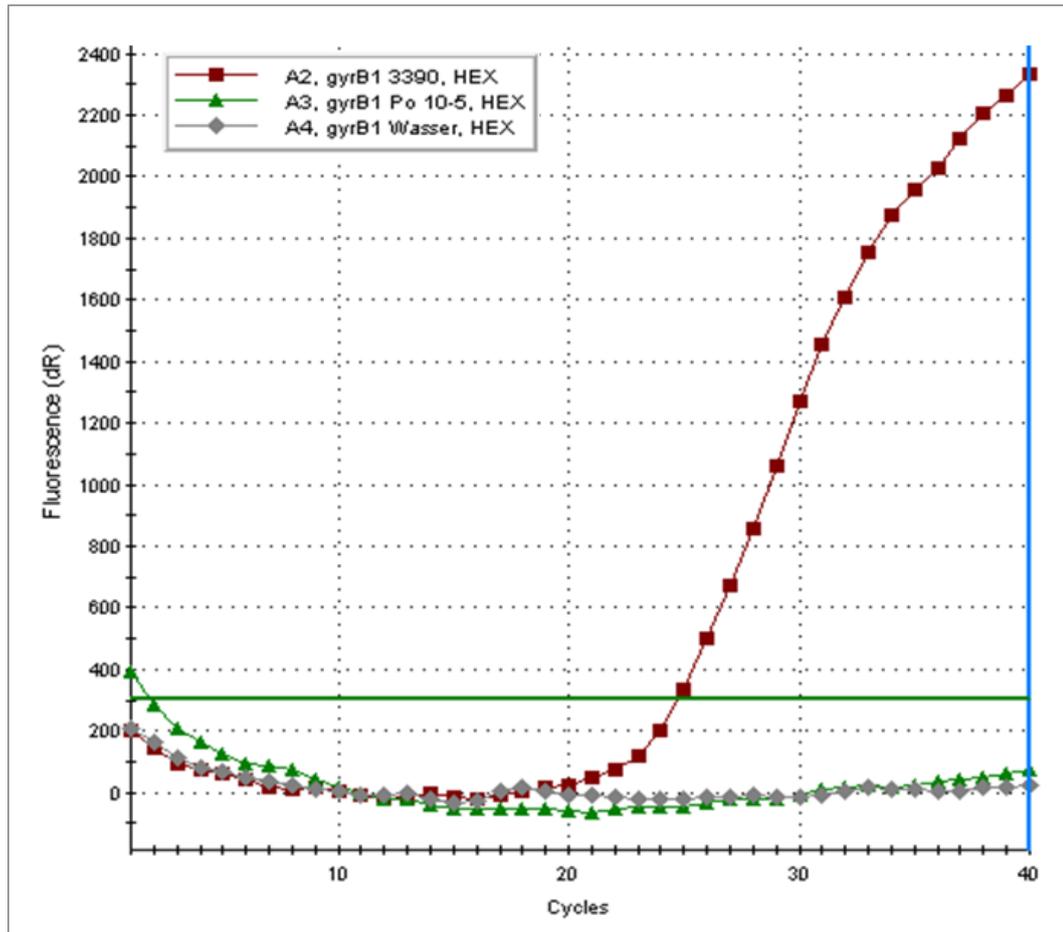


Abb. 22: Amplifikationskurve TM_gyrB1408 HEX-Signal. Die eingesetzte Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) wird als HEX-positiv charakterisiert. HEX-negativ ist die Mutationskontrolle Po 10^{-5} (grün). Die Wasserkontrolle (grau) weist einen flachen Kurvenverlauf auf.

3 Ergebnisse

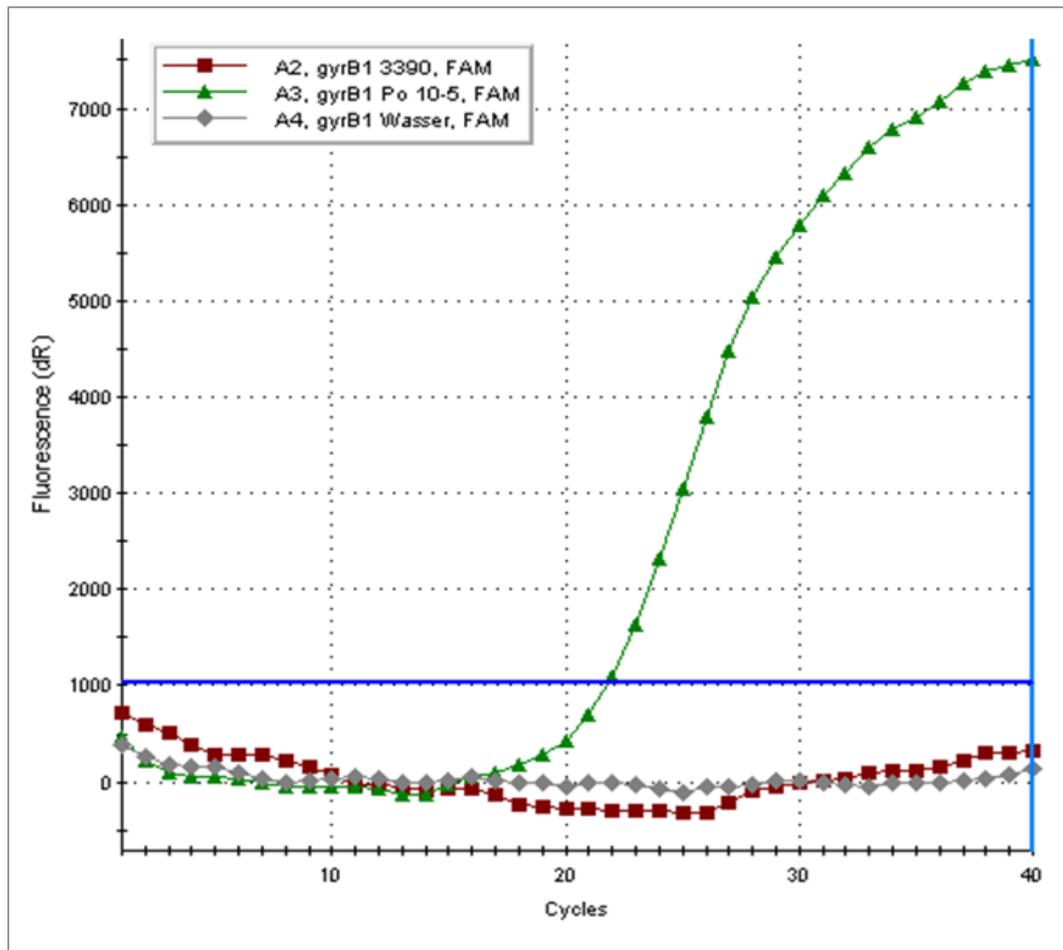


Abb. 23: Amplifikationskurve TM_gyrB1408 FAM-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) stellt sich FAM-negativ dar. Als FAM-positiv wird die Mutationskontrolle Po 10^{-5} (grün) bewertet. Die Wasserkontrolle (grau) beschreibt einen flachen Kurvenverlauf.

Die Auswertung durch die Ct-Werte, welche in Tab. 32 gelistet sind, ergibt die gleichen Ergebnisse. Beide Wildtypkontrollen *B. anthracis* Stamm 3352 und *B. anthracis* Stamm 3390 sind HEX-positiv, die Mutationskontrolle Po 10^{-5} hingegen FAM-positiv.

Tab. 32: Auswertung TM_gyrB1408 über Ct-Werte

<i>Probe</i>	<i>Ct-Wert HEX</i>	<i>Ct-Wert FAM</i>
<i>B. anthracis</i> Stamm 3390	23,29	kein Ct
Po 10^{-5}	kein Ct	20,52
Wasser	kein Ct	kein Ct

3 Ergebnisse

3.6.5 Protokoll: TM_gyrB1423

Eine Auswertung für dieses Protokoll verlief vergleichbar zu Kapitel 3.6.1. So zeigen sich in den beiden Abbildungen Abb. 24 und Abb. 25 die eingesetzte Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau) HEX-positiv sowie die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ (grün) FAM-positiv.

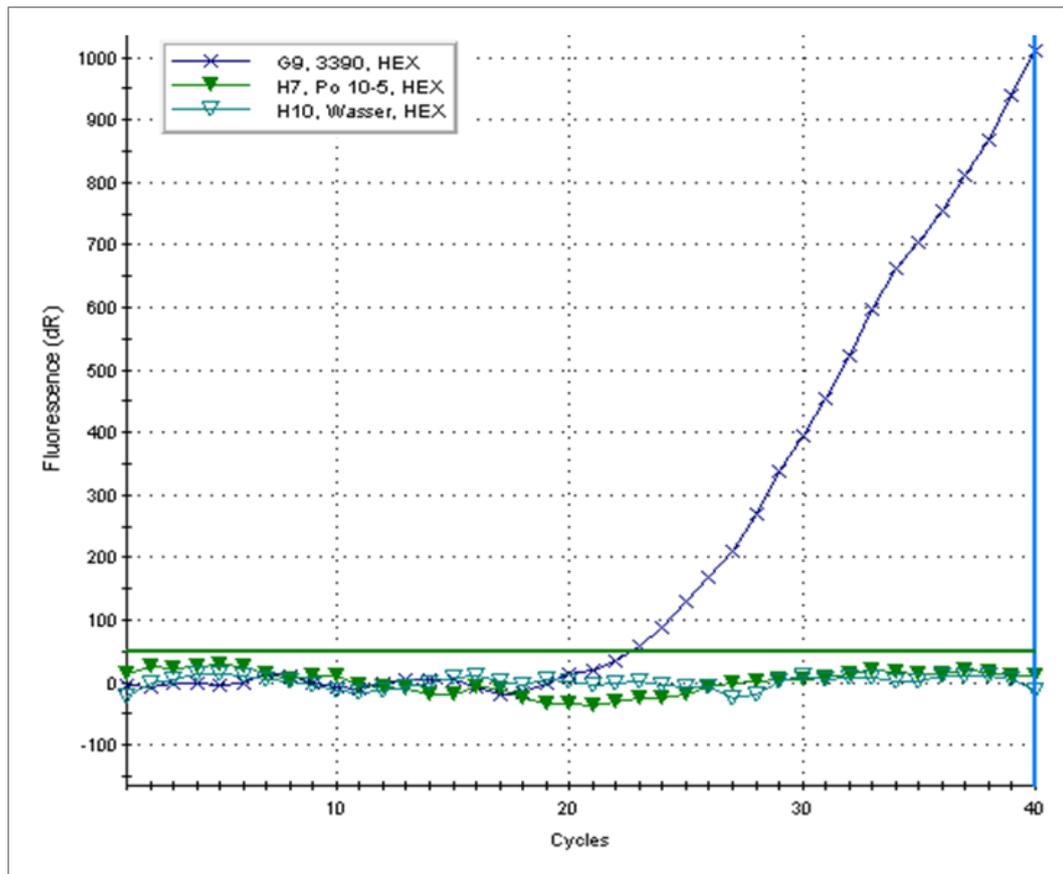


Abb. 24: Amplifikationskurve TM_gyrB1423 HEX-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau) kann als HEX-positiv beschrieben werden. Die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ (grün) ist HEX-negativ. Einen flachen Kurvenverlauf kennzeichnet die Wasserkontrolle (türkis).

3 Ergebnisse

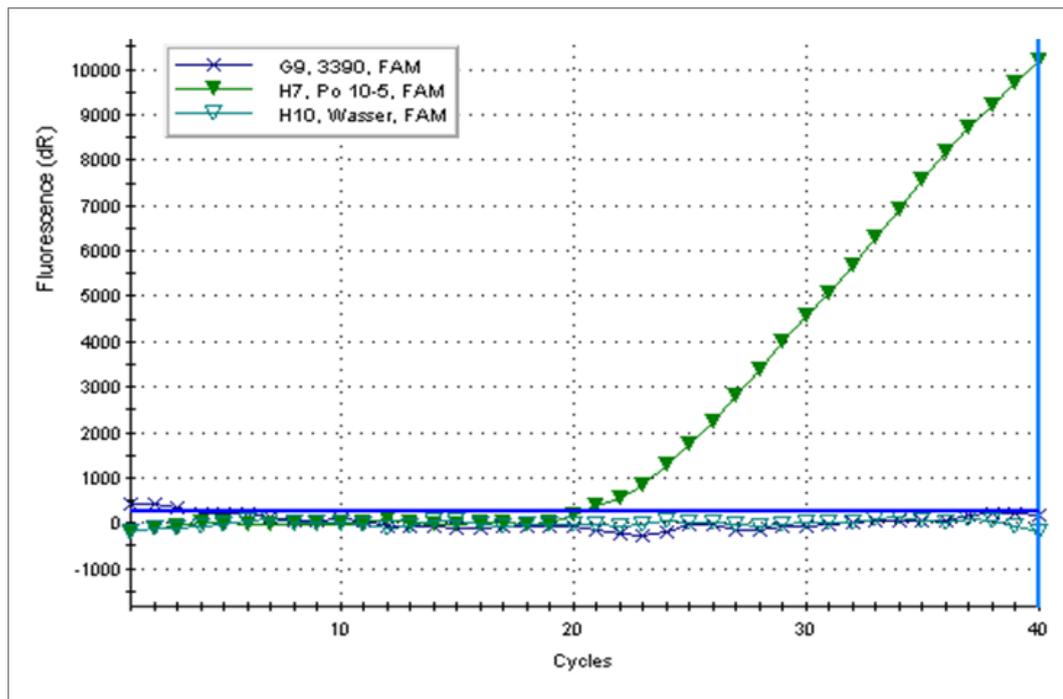


Abb. 25: Amplifikationskurve TM_gyrB1423 FAM-Signal. Als FAM-negativ definiert sich die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (blau). Die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ (grün) ist FAM-positiv. Die Wasserkontrolle (türkis) besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

Die Ct-Werte, siehe Tab. 33, legen die gleichen Ergebnisse wie die Amplifikationskurven fest. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 ist HEX-positiv und die Mutationskontrolle Po 10⁻⁵ FAM-positiv.

Tab. 33: Auswertung TM_gyrB1423 über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> 3390	22,73	kein Ct
Po 10 ⁻⁵	kein Ct	20,41
Wasser	kein Ct	kein Ct

3.6.6 Protokoll: TM_parC242

Die Auswertung des Protokolls TM_parC242 verlief ähnlich wie in den beiden Kapiteln 3.6.1 und 3.6.3 beschrieben.

In der Abb. 26 zeigt nur die Amplifikationskurve für die Wildtypkontrolle *B.*

3 Ergebnisse

anthracis Stamm 3390 (rot) einen Fluoreszenzanstieg, welcher diese Probe als HEX-positiv kennzeichnet. Die Abb. 27 zeigt drei FAM-positive Kurven. Dies sind die Mutationskontrollen Po A 10^{-5} (blau) und Po T 10^{-5} (grau) sowie die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot). Da der Anstieg des FAM für die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) ca. vier Zyklen später erfolgt als derjenige für HEX, ist trotzdem eine endgültige Zuordnung dieser Wildtypkontrolle als HEX-positiv möglich.

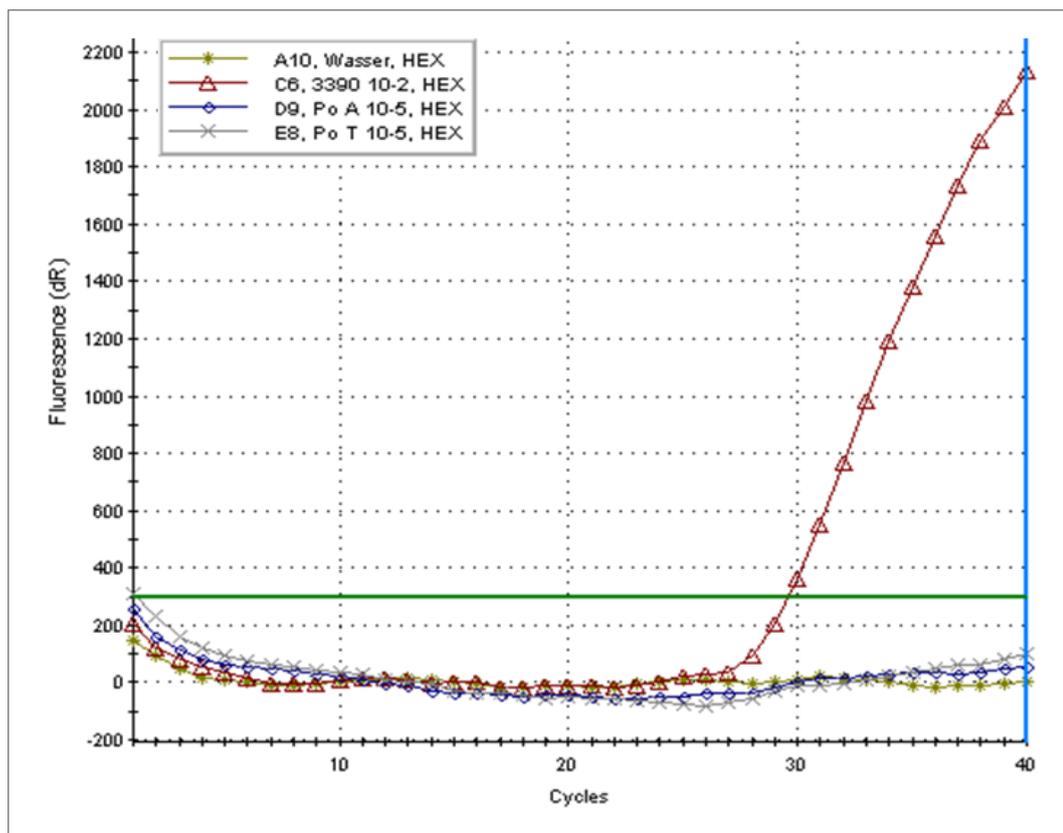


Abb. 26: Amplifikationskurve TM_parC242 HEX-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) ist HEX-positiv. Beide Mutationskontrollen PoA 10^{-5} (blau) und PoT 10^{-5} (grau), welche jeweils eine der beiden möglichen Mutations-Base enthalten, können HEX-negativ angesehen werden. Die Wasserkontrolle wird durch einen flachen Kurvenverlauf gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

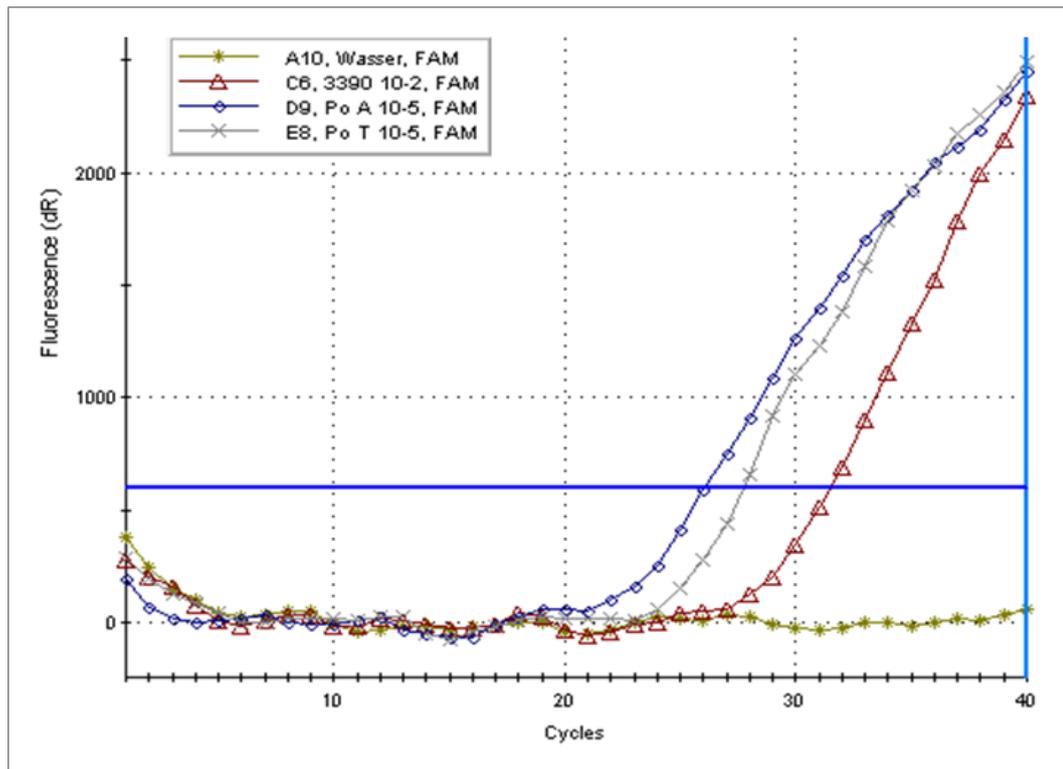


Abb. 27: Amplifikationskurve TM_parC242 FAM-Signal. Sämtliche eingesetzten Kontrollen sind FAM-positiv. Die beiden Mutationskontrollen PoA 10^{-5} (blau) und PoT 10^{-5} (grau) sind durch den früheren Anstieg stärker FAM-positiv zu bezeichnen als die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot). Die Wasserkontrolle besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

Die Tab. 34 liefert die gleichen Ergebnisse wie die beiden zugehörigen Abbildungen (Abb. 26, Abb. 27). Auch hier erfolgt eine endgültige Zuordnung der Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 durch den deutlich niedrigeren Ct-Wert HEX als HEX-positiv. Beide Mutationskontrollen Po A 10^{-5} und Po T 10^{-5} werden FAM-positiv charakterisiert.

Tab. 34: Auswertung TM_parC242 über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-2}	30,14	33,48
Po A 10^{-5}	kein Ct	29,44
Po T 10^{-5}	kein Ct	28,55
Wasser	kein Ct	kein Ct

3 Ergebnisse

3.6.7 Protokoll: TM_parC244

Auch die Auswertung dieses Protokolls erfolgte gleich dem Kapitel 3.6.1.

Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) kann als HEX- und FAM-positiv beschrieben werden, wie in den Abbildungen Abb. 28 und Abb. 29 ersichtlich. Jedoch erfolgt der Fluoreszenzanstieg für das HEX-Signal zwei Zyklen früher mit einem steileren Kurvenverlauf, sodass die Zuteilung als HEX-positiv stärker begründet werden kann. Die Mutationskontrolle Po A 10^{-5} definiert sich als FAM-positiv.

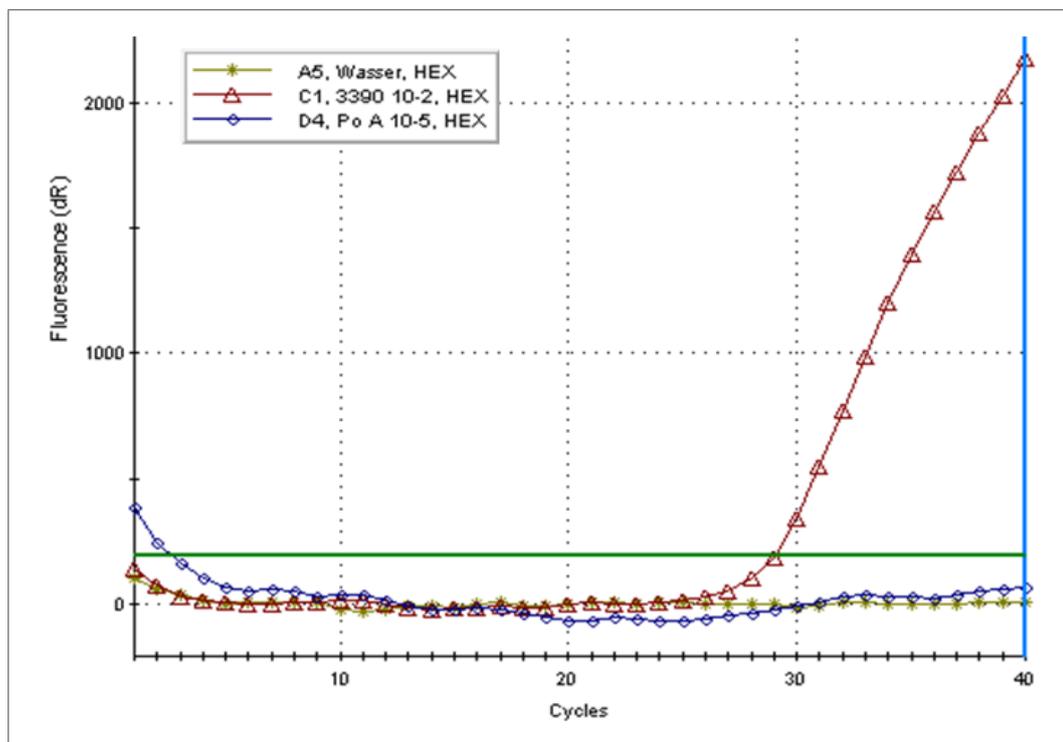


Abb. 28: Amplifikationskurve TM_parC244 HEX-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 10^{-2} (rot) wird als HEX-positiv definiert. Die Mutationskontrolle PoA 10^{-5} (blau) hingegen ist HEX-negativ. Die Wasserkontrolle (gelb) weist einen flachen Kurvenverlauf auf.

3 Ergebnisse

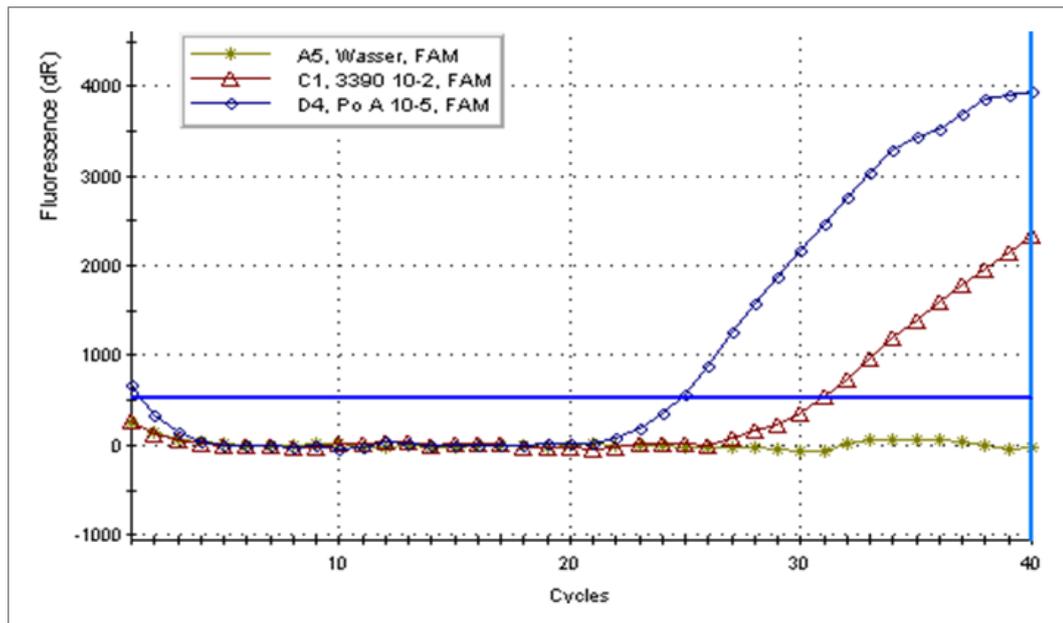


Abb. 29: Amplifikationskurve TM_parC244 FAM-Signal. Die Negativ- und die Mutationskontrolle definieren sich beide als FAM-positiv. Jedoch steigt die Amplifikationskurve der Mutationskontrolle PoA 10⁻⁵ (blau) früher und höher an als diejenige der Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (rot) und ist somit als stärker FAM-positiv zu bezeichnen. Die Wasserkontrolle (gelb) besitzt einen flachen Kurvenverlauf.

Anhand der Tab. 35 sind die gleichen Ergebnisse wie durch die Amplifikationskurven ersichtlich. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 gilt HEX-positiv, da dieser Ct-Wert niedriger ist als der Ct-Wert FAM. Die Mutationskontrolle Po A 10⁻⁵ wird FAM-positiv festgelegt.

Tab. 35: Auswertung TM_parC244 über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> 3390 10 ⁻²	29,02	31
Po A 10 ⁻⁵	kein Ct	24,89
Wasser	kein Ct	kein Ct

3.6.8 Protokoll: TM_parC253

Auch die Auswertung dieses Protokolls verlief ähnlich wie in Kapitel 3.6.1.

Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 (türkis) wird anhand der Abb. 30 dem HEX zugeteilt. Die Abb. 31 hingegen kennzeichnet die Mutationskontrolle Po A 10⁻⁵ (blau) FAM-positiv.

3 Ergebnisse

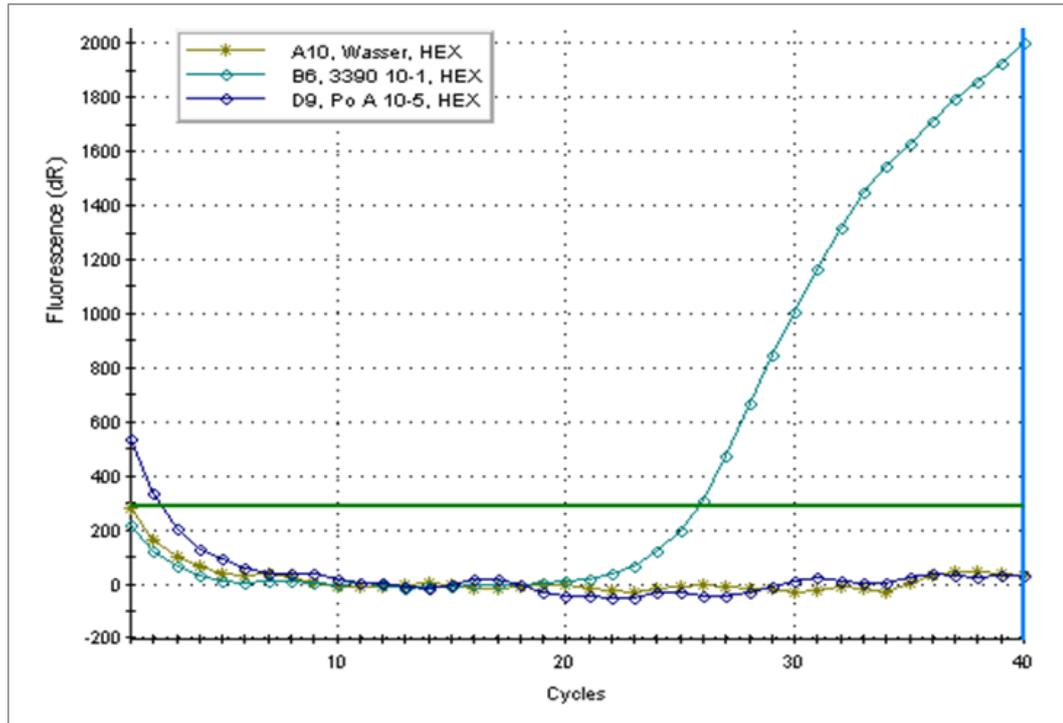


Abb. 30: Amplifikationskurve TM_parC253 HEX-Signal. HEX-positiv ist die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 10⁻¹ (türkis). Die Mutationskontrolle PoA 10⁻⁵ (blau) ist HEX-negativ. Einen flachen Kurvenverlauf besitzt die Wasserkontrolle (gelb).

3 Ergebnisse

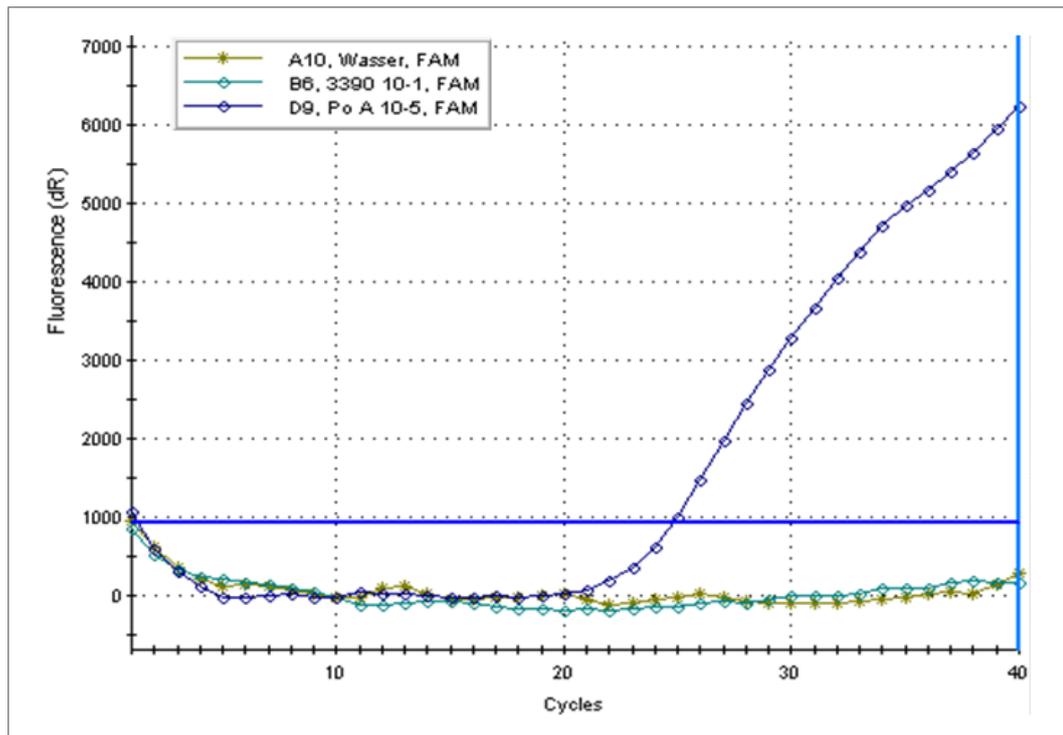


Abb. 31: Amplifikationskurve TM_{parC253} FAM-Signal. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 10⁻¹ (türkis) ist FAM-negativ, die Mutationskontrolle Po A 10⁻⁵ (blau) hingegen FAM-positiv. Die Wasserkontrolle (gelb) beschreibt einen flachen Kurvenverlauf.

Die Ct-Werte, siehe Tab. 36, teilen die beiden eingesetzten Proben gleich den Amplifikationskurven ein. Die Wildtypkontrolle *B. anthracis* Stamm 3390 10⁻¹ ist HEX-positiv und die Mutationskontrolle Po A 10⁻⁵ wird FAM-positiv.

Tab. 36: Auswertung TM_{parC253} über Ct-Werte

Probe	Ct-Wert HEX	Ct-Wert FAM
<i>B. anthracis</i> 3390 10 ⁻¹	25,86	kein Ct
Po A 10 ⁻⁵	kein Ct	24,86
Wasser	kein Ct	kein Ct

3.6.9 Sensitivität und Spezifität

Jedes TaqMan-Protokoll wurde mit verschiedenen Negativ- und Mutationskontrollen inklusive Verdünnungsreihen sowie Kontrollproben anderer *Bacillus* spp. getestet. Dadurch konnten Sensitivität und Spezifität

3 Ergebnisse

bestimmt werden. Die Versuche mit den Verdünnungsreihen erzielten je TaqMan-Assay die gleichen Ergebnisse. Unterschiedliche Resultate entstanden in den Durchläufen mit den *Bacillus* spp. Kontrollproben.

Anhand der Testungen mit Verdünnungsreihen aus Wildtypkontrollen, konnte festgestellt werden, dass Proben mit einer Konzentration von 10^3 bis 10^4 Kopien/ μ l die besten Ergebnisse erzielen. Die Ct-Werte dieser Proben lagen zwischen 22 und 30. Diese Amplifikationskurven wurden durch ihren typischen Verlauf, dem exponentiellen Anstieg gefolgt von der Plateau-Phase, geprägt. In Abb. 32 sind dies die grüne und die graue Kurve mit Konzentrationen von $1,5 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^3$ Kopien/ μ l. Proben mit einer höheren Konzentration besaßen einen früheren jedoch deutlich flacheren Anstieg. Die blaue ($1,5 \times 10^6$ Kopien/ μ l) und die rote ($1,5 \times 10^5$ Kopien/ μ l) Kurve aus Abb. 32 verdeutlichen dies. Je niedriger die Konzentration der eingesetzten Probe war desto größer wurde der Ct-Wert und desto niedriger verlief der Anstieg der Amplifikationskurve, siehe olivfarbene ($1,5 \times 10^2$ Kopien/ μ l) und türkisfarbene (15 Kopien/ μ l) Kurven in Abb. 32. Konzentrationen niedriger als 10 Kopien/ μ l wurden nicht amplifiziert und besaßen somit einen flachen Kurvenverlauf. Dies sind in Abb. 32 die violette (1,5 Kopien/ μ l) und die orangene ($1,5 \times 10^{-1}$ Kopien/ μ l) Kurve.

3 Ergebnisse

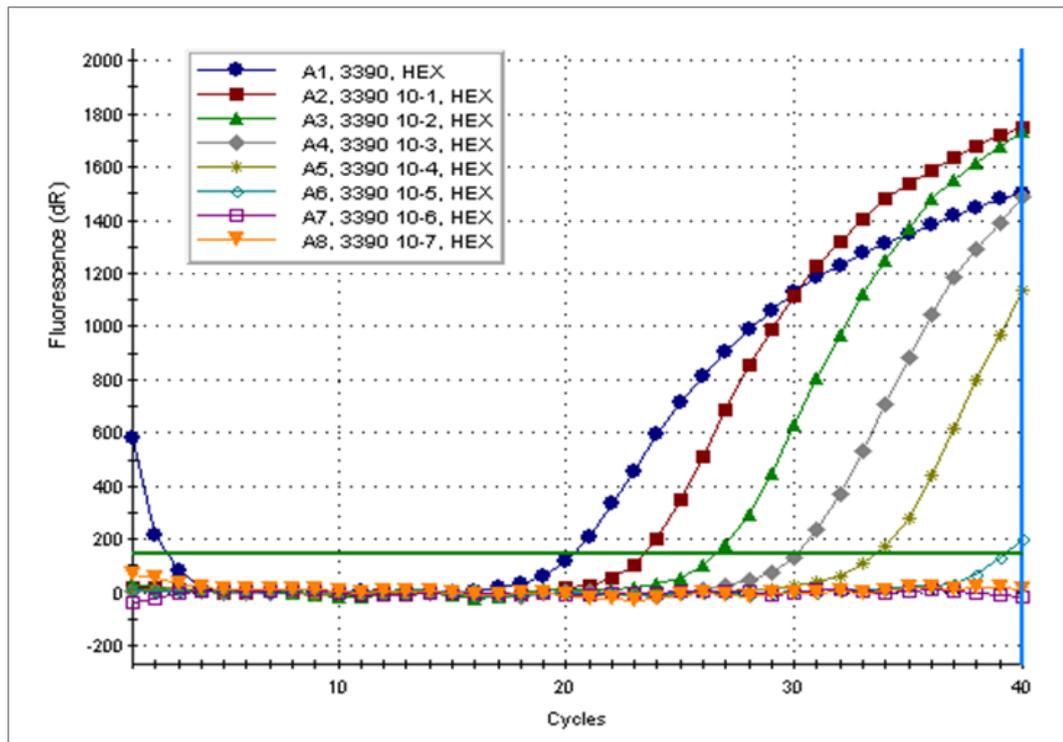


Abb. 32: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA265 der Wildtypkontrolle *B. anthracis* 3390 mit Verdünnungsreihe. Dargestellt sind die Kurvenverläufe verschiedener Verdünnungsstufen des *B. anthracis* Stammes 3390. Die Verdünnung erfolgte jeweils in einem Verhältnis von 1:10 von der unverdünnten Probe bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} . Die Kurve der Probe 3390 (blau) steigt als erste der Kurven an, besitzt jedoch einen flacheren Verlauf. Die Amplifikationskurven der Proben 3390 10^{-1} bis 3390 10^{-5} (rot, grün, grau, olive, türkis) besitzen einen annähernd parallelen Verlauf mit einem späteren Anstieg je größer die Verdünnungsstufe der jeweiligen Probe. Die beiden höchsten Stufen der Verdünnung 3390 10^{-6} (violett) und 3390 10^{-7} (orange) besitzen einen flachen Kurvenverlauf.

3 Ergebnisse

Tab. 37: Ct-Werte HEX TM_gyrA265 der Wildtypkontrolle *B. anthracis* 3390 mit Verdünnungsreihe

<i>Probe</i>	<i>Konzentration in Kopien/μl</i>	<i>Ct-Wert HEX</i>
<i>B. anthracis</i> 3390	$1,5 \times 10^6$	20,44
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-1}	$1,5 \times 10^5$	23,54
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-2}	$1,5 \times 10^4$	26,65
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-3}	$1,5 \times 10^3$	30,2
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-4}	$1,5 \times 10^2$	33,68
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-5}	$1,5 \times 10^1$	39,32
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-6}	$1,5 \times 10^0$	kein Ct
<i>B. anthracis</i> 3390 10^{-7}	$1,5 \times 10^{-1}$	kein Ct

Auch für die Mutationskontrollen, welche zumeist durch künstliche Templates dargestellt wurden, konnten durch die Versuche mit Verdünnungsreihen optimale Konzentrationen festgestellt werden. Diese waren zwischen $6,6 \times 10^3$ und $6,6$ Kopien/μl. Die Ct-Werte dieser Proben lagen zwischen 20 und 30. Die Kurven dieser Proben besaßen den typischen optimalen Verlauf mit exponentiellem Anstieg und Plateau. In Abb. 33 sind die graue ($6,6 \times 10^3$ Kopien/μl) und die olivfarbene ($6,6 \times 10^2$ Kopien/μl) Kurve, die Proben mit den optimalen Konzentrationen. Bei Konzentrationen größer oder gleich $6,6 \times 10^7$ Kopien/μl entstanden nicht auswertbare Kurvenverläufe, wie die orangefarbene (Dreieck) Kurve in Abb. 33. Proben mit Konzentrationen zwischen $6,6 \times 10^6$ und $6,6 \times 10^4$ Kopien/μl zeigten früh ansteigende Kurven, welche aber ein frühes Plateau besaßen. Dies sind in Abb. 33 die Kurven in den Farben und Formen blaues Kreuz ($6,6 \times 10^6$ Kopien/μl), rot ($6,6 \times 10^5$ Kopien/μl) sowie grün ($6,6 \times 10^4$ Kopien/μl). Niedrigere Konzentrationen als $6,6$ Kopien/μl waren durch einen höheren Ct-Wert und teilweise flacheren Kurvenverlauf gekennzeichnet. In Abb. 33 zeigen dies die türkisfarbene, violette und orange (Kreis) Kurve. Einen flachen Kurvenverlauf und keine Amplifikation besaßen Proben mit Konzentrationen ab $6,6 \times 10^{-2}$ Kopien/μl und kleiner, wie in Abb. 33 die blaue (Viereck) Kurve.

3 Ergebnisse

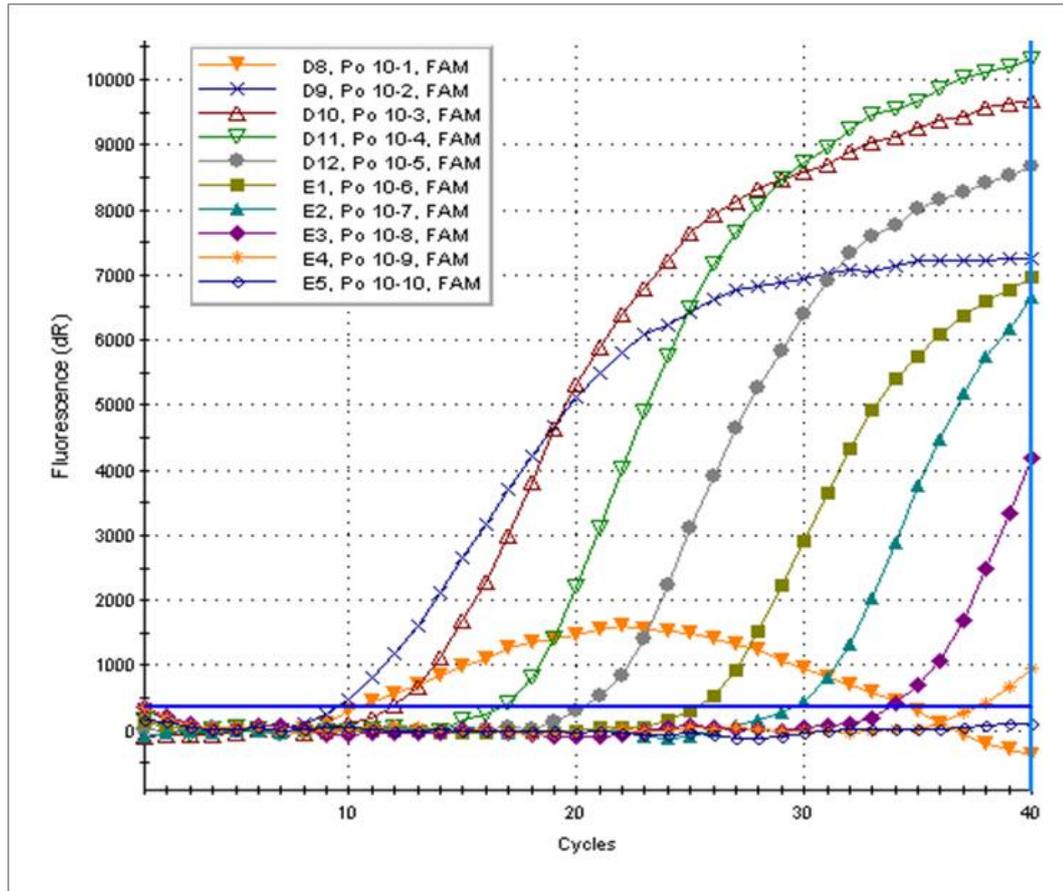


Abb. 33: Amplifikationskurven FAM-Signal TM_gyrB1408 der Mutationskontrolle Po mit Verdünnungsreihe. Dargestellt sind die Kurvenverläufe verschiedener Verdünnungsstufen eines synthetischen Templates, welches als Mutationskontrolle genutzt wurde. Die Verdünnung erfolgte jeweils in einem Verhältnis von 1:10 von der Verdünnungsstufe 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰. Die Kurve der Probe Po 10⁻¹ (orange, Dreieck) zeigt einen nicht auswertbaren Verlauf mit einem leichten An- und Abstieg im Verlauf der PCR. Einen deutlichen Fluoreszenzanstieg zeigen die Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁹. Hierbei besitzen die beiden höchst konzentrierten Stufen 10⁻² (blau, Kreuz) und 10⁻³ (28) im Vergleich einen flacheren Kurvenverlauf. Die Amplifikationskurve der Stufe 10⁻¹⁰ (blau, Raute) verläuft flach.

3 Ergebnisse

Tab. 38: Ct-Werte FAM-Signal TM_gyrB1408 der Mutationskontrolle Po mit Verdünnungsreihe

Probe	Konzentration in Kopien/μl	Ct-Wert FAM
Po 10 ⁻¹	6,6 x 10 ⁷	(10,38)
Po 10 ⁻²	6,6 x 10 ⁶	9,53
Po 10 ⁻³	6,6 x 10 ⁵	11,81
Po 10 ⁻⁴	6,6 x 10 ⁴	16,6
Po 10 ⁻⁵	6,6 x 10 ³	20,22
Po 10 ⁻⁶	6,6 x 10 ²	25,28
Po 10 ⁻⁷	6,6 x 10 ¹	29,47
Po 10 ⁻⁸	6,6 x 10 ⁰	33,75
Po 10 ⁻⁹	6,6 x 10 ⁻¹	37,56
Po 10 ⁻¹⁰	6,6 x 10 ⁻²	kein Ct

Die Versuche mit verschiedenen *Bacillus* spp. lieferten unterschiedliche Resultate. Gemeinsam war allen Protokollen, dass die eingesetzten Negativproben *Bacillus* spp. keine Ct-Werte für FAM besaßen. Eine Ankopplung der FAM-Sonden fand bei keiner dieser Proben statt. Sie sind daher alle als FAM-negativ zu definieren. Die Differenzen bestanden in der Entstehung von HEX-Signalen. Diese werden in der Tab. 39 dargestellt. So sind sämtliche 29 *B. anthracis* Stämme bis auf eine Ausnahme in allen Protokollen HEX-positiv. Die anderen *Bacillus* spp. zeigen verschiedene Profile.

3 Ergebnisse

Tab. 39: Ct-Werte HEX-Signal der verschiedenen *Bacillus*. spp. für jedes TaqMan-Protokoll (+ bedeutet Ct-Wert, - bedeutet kein Ct-Wert).

<i>Probe</i>	<i>TM_gyrA</i> 254	<i>TM_gyrA</i> 265	<i>TM_gyrA</i> 266	<i>TM_gyrB</i> 1408	<i>TM_gyrB</i> 1423	<i>TM_parC</i> 242	<i>TM_parC</i> 244	<i>TM_parC</i> 253
<i>B. anthracis</i> Sterne + 28 weitere Stämme	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> Italien	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>B. cereus</i> ATCC10987	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i> E33L	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>B. cereus</i> Idaho Falls	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. pumilis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>B. brevis</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+

In Abb. 34 und Tab. 40 sind die Ergebnisse nach einem Durchlauf des Protokolls *TM_gyrA254* mit den *Bacillus* spp. dargestellt. Die Kurven steigen alle an und sind somit alle HEX-positiv. Die Stärke des Anstiegs ist jedoch je Probe verschieden. So zeigt *B. anthracis* Sterne (türkis) einen exponentiellen Anstieg. Im Gegensatz dazu verläuft die Kurve des *B. thuringiensis* (grün) mit einem flachen Anstieg.

3 Ergebnisse

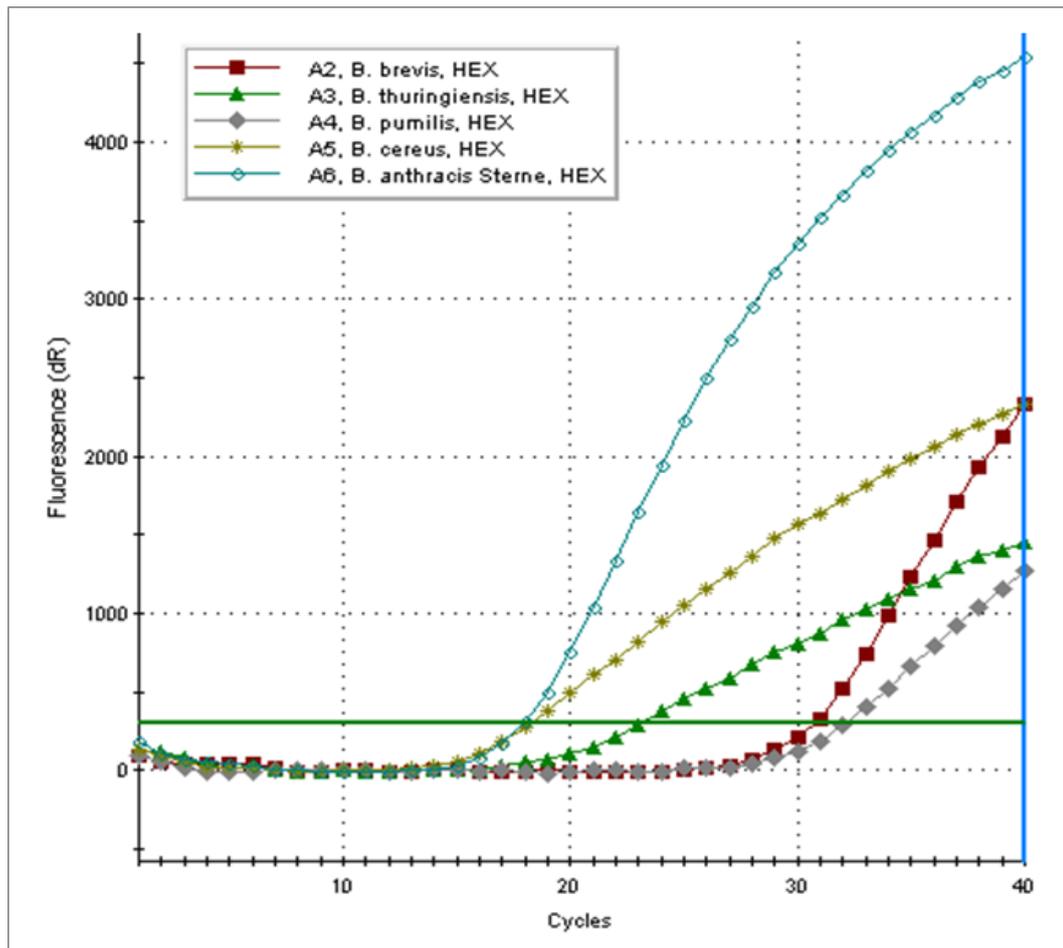


Abb. 34: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA254
Kontrollproben verschiedener *Bacillus* spp. Alle eingesetzten Proben zeigen einen Fluoreszenzanstieg und sind HEX-positiv.

Tab. 40: Ct-Werte HEX TM_gyrA254 Kontrollproben verschiedener *Bacillus* spp.

<i>Probe</i>	<i>Ct-Wert HEX</i>
<i>B. brevis</i>	30,81
<i>B. thuringiensis</i>	23,25
<i>B. pumilis</i>	32,18
<i>B. cereus</i> E33L	18,33
<i>B. anthracis</i> Sterne	17,97

Das Protokoll TM_gyrA266 zeigte ein anderes Ergebnis als TM_gyrA254. In diesem zeigten drei Proben einen Fluoreszenzanstieg und eine HEX-

3 Ergebnisse

Positivität. Dies sind, siehe Abb. 35 und Tab. 41, *B. anthracis* Italien (grün), *B. anthracis* Sterne (blau) und, zu einem deutlich späteren Zyklus, *B. brevis* (olive). Die anderen Proben waren HEX-negativ.

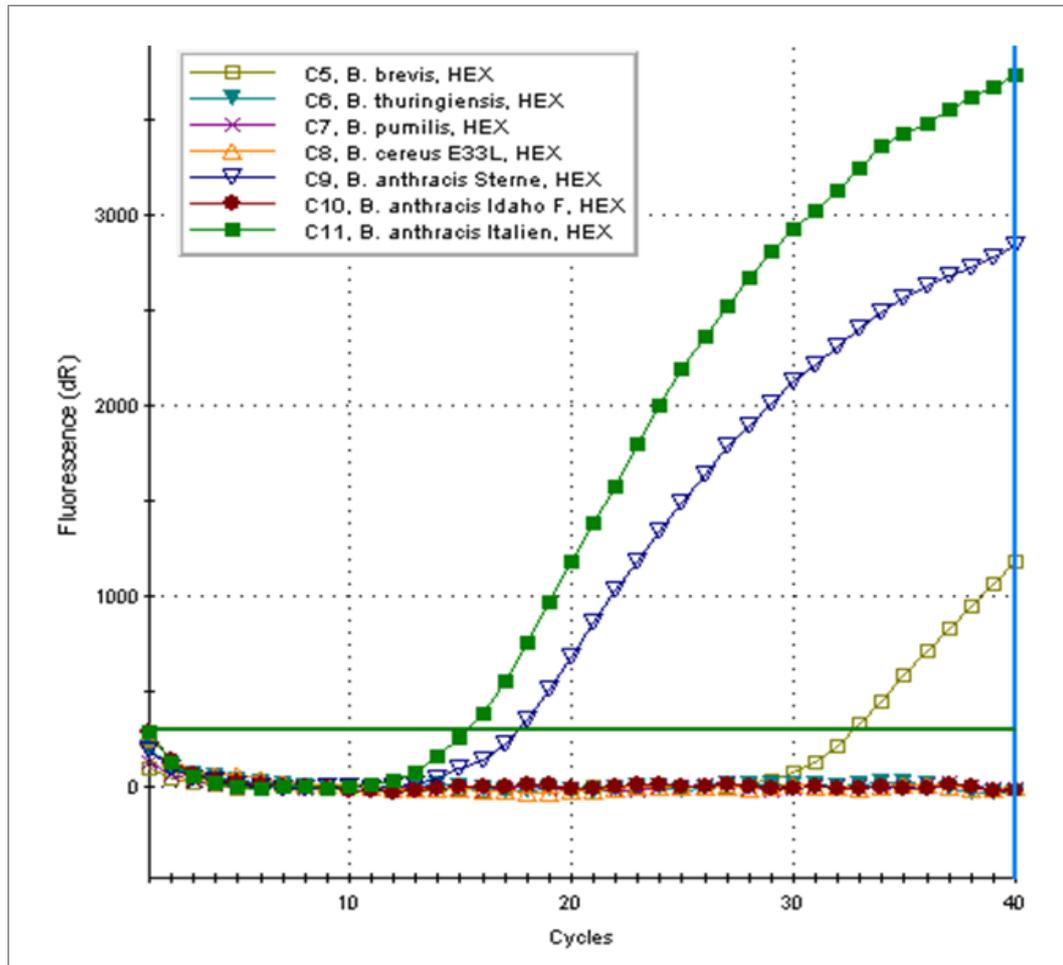


Abb. 35: Amplifikationskurven HEX-Signal TM_gyrA266

Kontrollproben verschiedener *Bacillus* spp. Die beiden Proben *B. anthracis* Stamm Sterne (blau) und *B. anthracis* Stamm Italien besitzen einen deutlichen Kurvenanstieg. Auch die Amplifikationskurve der Probe *B. brevis* (olive) steigt an. Diese drei Proben sind HEX-positiv. Die restlichen eingesetzten Proben *B. thuringiensis* (türkis), *B. pumilis* (violett), *B. cereus* E33L (orange) und *B. cereus* Idaho Falls (rot) sind durch einen flachen Kurvenverlauf gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Tab. 41: Ct-Werte HEX TM_gyrA266 Kontrollproben verschiedener *Bacillus* spp.

<i>Probe</i>	<i>Ct-Wert HEX</i>
<i>B. brevis</i>	32,74
<i>B. thuringiensis</i>	kein Ct
<i>B. pumilis</i>	kein Ct
<i>B. cereus</i> E33L	kein Ct
<i>B. anthracis</i> Sterne	17,57
<i>B. cereus</i> Idaho Falls	kein Ct
<i>B. anthracis</i> Italien	15,37

4 Diskussion

4.1 Generierung resistenter *B. cereus* Mutanten

Für PCR-basierte Assays zum Nachweis von Resistenzen sind geeignete Mutationskontrollen wesentlich, doch leider ist für viele potentielle genetische Veränderungen von *B. anthracis* keine DNA aus Isolaten verfügbar. So standen im Rahmen dieser Arbeit auch keine CIP-resistenten *B. anthracis* Stämme zur Verfügung. Daher erschien es notwendig, zu Beginn dieser Arbeit durch die Generierung von *B. cereus* Mutanten solche Kontrollen zu entwickeln.

Die Entscheidung, statt eines *B. anthracis* Stammes, einen *B. cereus* Stamm zu nutzen, erfolgte aufgrund der *Dual-Use-Research-of-Concern*-(DURC)-Problematik. So zählt *B. anthracis* im Gegensatz zu *B. cereus* als ein Agens des Bioterrorismus. Als dieser genutzt, kann *B. anthracis* zu verheerenden Folgen führen, wie es zuletzt durch die Briefanschläge in Amerika im Jahr 2001 geschah (1). Laut einer Untersuchung der WHO kann es bei einer Freisetzung von 50 kg *B. anthracis* Sporen innerhalb einer Bevölkerung von ca. 500000 Menschen zu 125000 Krankenhauseinweisungen und 95000 Todesfällen kommen (1). Ein gegen CIP resistenter *B. anthracis* könnte diese drastischen Folgen durch die Problematik einer primär fehlenden effektiven Therapie noch ausweiten. Im Gegensatz dazu zählt der gewählte *B. cereus* Stamm ATCC10987 zu den wenig pathogenen Vertretern des *B. cereus* (44).

Die Voraussetzung der Nutzung dieses *B. cereus* Stammes war die nahe genotypische Verwandtschaft zwischen beiden Erregern. Durch Gesamtgenomesequenzierungen von *B. cereus* ATCC 10987, *B. anthracis* Ames Ancestor sowie *B. cereus* 14579 konnte eine engere Verwandtschaft von *B. cereus* ATCC 10987 zu *B. anthracis* als zu anderen Vertretern von *B. cereus* festgestellt werden, wie in Abb. 36 ersichtlich. So sind die Chromosome von *B. cereus* ATCC 10987 und *B. anthracis* Ames Ancestor

4 Diskussion

zu 93,94% identisch. Die Chromosome von *B. cereus* ATCC 10987 und *B. cereus* ATCC 14579 im Gegensatz dazu nur zu 90,94% identisch (44). Es gibt zwischen dem *B. cereus* ATCC 10987 und dem *B. anthracis* Ames Ancestor insbesondere nur wenige Differenzen der Basenabfolge innerhalb der vier relevanten Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*. Im Gen *gyrA* treten bei insgesamt 2472 bp nur 60 Differenzen zwischen dem *B. cereus* ATCC 10987 und dem *B. anthracis* Ames Ancestor auf. Innerhalb der 90 bp, welche für die entwickelten Assays relevant waren, sind es sogar nur drei Unterschiede (37, 44, 45). Diese geringe Anzahl an Differenzen konnte in der Erstellung der Primer und Sonden für die real-time-PCR berücksichtigt werden, sodass sie vernachlässigt wurden. Ein weiterer Faktor, der die Nutzung des Stammes ATCC 10987 als Modell für *B. anthracis* begünstigte, war das Vorhandensein des Plasmids pBc10987. Dieses Plasmid besitzt eine geringe Ähnlichkeit mit dem Plasmid pX01. Sie sind zu 40% identisch (44). Jedoch fehlt dem Plasmid pBc10987 die Codierung für das 3-Komponenten-AB-Toxin, sodass keine Milzbrand-ähnliche Symptomatik bei einer Infektion entstehen kann.

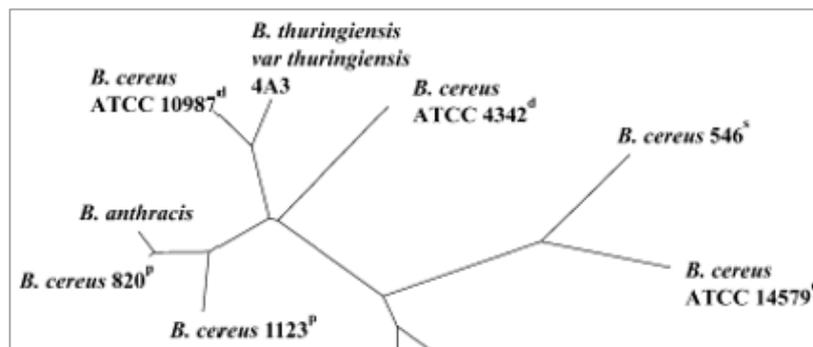


Abb. 36: Phylogenetischer Baum einiger Vertreter der *B. cereus sensu lato* Gruppe. Dieser Baum basiert auf dem Vergleich der Nukleotidsequenzen von sieben *Housekeeping*-Genen. Diese zeigen die nahe Verwandtschaft von *B. cereus* ATCC 10987 zu *B. anthracis*. Nur ein Vertreter von *B. cereus* ist näher mit *B. anthracis* verwandt. Die hochgestellten Buchstaben zeigen den Ursprung der Stämme an: ^d= Milch, ^p= Klinik, ^s= Erde. (Quelle: (44))

Die natürliche Selektion resistenter Mutanten durch die Anzucht auf antibiotikahaltigem Agar wurde zuvor schon im Rahmen anderer Studien, unter anderem von *Price et al.* (2003), durchgeführt. Insbesondere die

4 Diskussion

Literatur der beiden Studien von *Price et al.* (2003) und *Antwerpen et al.* (2006), in welcher auch der *B. cereus* ATCC 10987 genutzt wurde, diente als Grundlage, auf der das eigene Prinzip zur Generierung der Mutanten aufgebaut und weiterentwickelt wurde. Die Erhöhung der MHK-Werte durch wiederholte Anzucht auf Agar-Platten mit steigenden Antibiotikakonzentrationen ist prinzipiell unkompliziert.

Leider können so auch durch unsachgemäße Verwendung von Antibiotika im klinischen Bereich schnell Resistenzen gegen CIP entstehen. Untersuchungen in Indien mit dem gram-positivem Erreger *Staphylococcus* (= *S.*) *aureus*, welcher häufig nosokomiale Infektionen verursacht, zeigten CIP-Resistenzen für Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme (= MRSA) mit einer Häufigkeit von 64,7 % und bei Methicillin-sensitiven *S. aureus* Stämmen (= MSSA) von 30,8 % auf (46). Auch der gram-negative Erreger *Pseudomonas aeruginosa*, welcher häufig nosokomiale Infektionen verursacht, weist zu ca. 35 % Resistenzen gegen CIP auf (47). Dass auch bei in der Umwelt und Klinik vorkommenden *B. anthracis* Stämmen durch die natürliche Selektion Resistenzen gegen CIP auftreten könnten, kann durch die ähnlich verlaufenden Versuche im Labor als sehr wahrscheinlich eingestuft werden.

4.1.1 Resistenz gegen Ciprofloxacin

Es wurden neun Mutanten mit erhöhten MHK-Werten gegen CIP generiert. Von diesen neun CIP-Mutanten erreichten sechs einen maximalen MHK-Wert von > 16 µg/ml. Auch wiederholte Versuche, diese Bakterien auf Agar-Platten mit 32 µg/ml CIP anzuzüchten, waren nicht erfolgreich. Die restlichen drei Mutanten erreichten den maximalen MHK-Wert von > 256 µg/ml. Es besteht die Möglichkeit, dass diese drei noch höhere Werte hätten erzielen können, aber die Anzucht auf höher konzentrierten Agar-Platten wurde nicht durchgeführt.

Eine der CIP-Mutanten, Nr. 1.3, wies einen SNP im Gen *gyrA* an Stelle 256 mit einer Mutation der Base Cytosin in ein Thymin auf. Dieser SNP wird in

4 Diskussion

der Literatur als der zuerst auftretende SNP, der eine Erhöhung des MHK-Wertes gegen CIP verursacht, beschrieben (26, 27, 34, 35, 48). In der Studie von *Price et al.* (2003) trat dieser SNP in einem plasmidlosen *B. anthracis* ab einem MHK-Wert von 0,5 µg/ml auf, was einer Erhöhung des ursprünglichen des MHK-Wertes um den Faktor 8,34 entspricht. *Antwerpen et al.* (2006) nutzten den *B. cereus* Stamm ATCC10987 und entdeckten auch diesen SNP bei einer geringen Erhöhung des MHK-Wertes. In der hier durchgeführten Studie trat dieser SNP ab einer Erhöhung des MHK-Wertes um den Faktor vier auf, das heißt bei einer Resistenz gegen 2 µg/ml CIP. In Tab. 42 wird ein Vergleich der entstehenden SNPs in der QRDR zwischen den Studien, welche ähnliche Untersuchungen durchgeführt haben, aufgestellt. Diese zeigt, dass in allen drei Studien, in denen der SNP *gyrA254* nicht bereits im Wildtyp vorhanden war, dieser SNP als erster auftritt (26, 27). Während in der hier durchgeführten Arbeit keine weiteren SNPs vorkommen, obwohl die neun Mutanten Erhöhungen der MHK-Werte um die Faktoren 32 beziehungsweise sogar 512 erreichten, entstehen in den anderen drei Studien mehr SNPs je weiter der MHK-Wert ansteigt. An zweiter Stelle in der Reihenfolge stehen immer SNPs im Gen *parC*, wobei die genaue Stelle und auch der Faktor, ab welchem der SNP auftritt, variieren (26, 27, 48). SNPs im Gen *gyrB* und zusätzliche SNPs in *gyrA* kommen an dritter Stelle vor und auch hier sind die genaue Stelle des SNPs und der Faktor der Erhöhung des MHK-Wertes verschieden. Der SNP *gyrA265* trat bisher nur bei *Price et al.* (2003) auf und besitzt die Besonderheit, dass er an erster wie auch an dritter Stelle entstehen kann.

Tab. 42: Vergleich SNP-Vorkommen in verschiedenen Studien und Faktor der Erhöhung des WT-MHK-Wertes bei erster Entstehung SNP mit Nummerierung der Reihenfolge des Auftretens in Klammern

Studie	gyrA 254	gyrA 265	gyrA 266	gyrB 1408	gyrB 1423	parC 242	parC 244	parC 253
diese Studie	4 (1)	-	-	-	-	-	-	-
Price et al. (2003)	8,34 (1)	8,34 (1, 3)	1067 (3)	-	1067 (3)	133,4 (2)	-	266,7 (2)
Grohs et al. (2004)	1* (1)	-	-	533,4 (3)	-	33,34 (2)	33,34 (2)	-
Antwerpen et al. (2007)	66,67 (1)	-	-	-	-	1067 (2)	-	1067 (2)

*= SNP bereits in WT vorhanden

Auch für andere Bakterienspezies wurden Untersuchungen hinsichtlich der Ursachen für Resistenzen gegen Fluorochinolone durchgeführt. So haben unter anderem *Takahata et al.* (1996) und *Hashem et al.* (2013) diese Problematik für MRSA erforscht. Beide Studien konnten sehr ähnliche und teilweise identische zu den in dieser Arbeit aufgeführten SNPs in der QRDR als Ursache einer Resistenz gegen CIP nachweisen (49, 50). So erhielten die MRSA Stämme von *Takahata et al.* (1996) die SNPs *gyrA254C>T*, *gyrA265G>A*, *gyrA266A>G*, *parC242C>T/A* und *parC253G>A* bei steigenden MHK-Werten gegen CIP. Zusätzlich nannten *Takahata et al.* (1996) jedoch auch Mutationen in dem Gen *norA*, welches eine membranassoziierte Efflux-Pumpe codiert, als mögliche Ursache für eine Fluorochinolon Resistenz. *Hashem et al.* (2013) führten die Untersuchungen weiter in diese Richtung und führten Mikrodilutionstests mit 26 CIP resistenten MRSA Stämmen mit und ohne Omeprazol sowie Piperine, beides sind Protonen-Pumpen-Inhibitoren, durch. Die Ergebnisse zeigten, dass von den 26 Stämmen nur fünf Stämme gleichbleibende CIP MHK-Werte in Gegenwart von Omeprazol besaßen sowie ein Stamm den gleichen CIP MHK-Wert in Gegenwart von Piperine. Weiterhin wurde die Höhe der Aufnahme von CIP in die Zelle untersucht. So konnte bei 42 % der 21 Stämme, welche eine Verringerung der MHK-Werte in Gegenwart von Omeprazol aufwiesen, eine Verringerung dieser nachgewiesen werden, wodurch die Vermutung, dass Protonen-Pumpen CIP aus der Zelle

4 Diskussion

ausschleusen und dadurch eine Resistenz auslösen, verstärkt wurde. Die restlichen Stämme zeigten nur eine geringe Verminderung der Akkumulation von CIP, sodass hier zusätzlich andere Mechanismen als Ursache der Resistenz wirken mussten. Daher wurden die Stämme auf Mutationen in der QRDR untersucht und es konnten wiederum ähnliche SNPs in *gyrA* und *gyrB*, wie bereits für *B. anthracis* bekannt, nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals auch *B. cereus* CIP-Mutanten erzeugt, welche trotz einer hohen Resistenz gegen CIP keine SNPs innerhalb der QRDR aufwiesen. Als Ursache der Resistenz werden wie für MRSA von *Hashem et al. (2013)* stark erhöhte Leistungen von Efflux-Pumpen vermutet. Diese Möglichkeit wird unter anderem von *Price et al. (2003)* durch Untersuchungen mit dem Efflux-Inhibitor INF271 angenommen. Die erhöhte Funktion solcher Efflux-Pumpen tritt in der Studie *Price et al. (2003)* jedoch erst bei hoch resistenten CIP-Mutanten, das heißt ab einer Erhöhung des MHK-Wertes um den Faktor 133,34, und nur in Kombination mit mehr als einem SNP in der QRDR auf. Des Weiteren bewirkt die Leistung der Efflux-Pumpen eine geringere Erhöhung des MHK-Wertes je mehr SNPs vorhanden sind. Diese Differenzen zu der hier durchgeführten Studie weisen auf andere Mechanismen der Wirkungsweise von Efflux-Pumpen hin.

In einer neueren Studie von *Serizawa et al. (2010)* wurde das Gesamtgenom CIP zweier resistenter *B. anthracis* Stämme sequenziert, um eventuell auftretende Mutationen in Genen, welche Efflux-Pumpen codieren, festzustellen. Hierbei konnten in einem Stamm Mutationen im Gen *GBAA0834*, welches den *Tet-Repressor* codiert, und in drei zu diesem Gen nah gelegenen Genen erkannt werden, während innerhalb der QRDR keine SNPs auftraten. Zu den drei genannten Genen gehörten *GBAA0832* und *GBAA0833*, die sehr wahrscheinlich Teile einer „small multidrug resistance“ (=SMR) Familie einer Efflux-Pumpe sind. Das dritte Gen *GBAA0835* besitzt eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz wie *NorA*, welches in *S. aureus* als Fluorochinolon-Resistenz auslösende Efflux-

4 Diskussion

Pumpe bekannt ist (51).

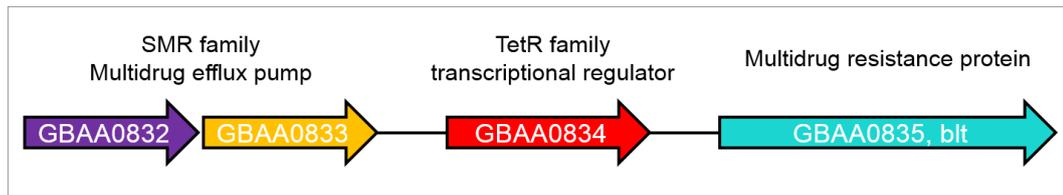


Abb. 37: Schematische Darstellung des *B. anthracis* Genoms rund um das Gen *GBAA0834* (roter Pfeil). Als violett- und orangefarbene Pfeile sind die beiden Gene *GBAA0832* und *GBAA0833*, welche Teile einer SMR Familie sind, gekennzeichnet. Der türkisfarbene Pfeil bezeichnet das abschließende Gen *GBAA0835*, das eine Efflux-Pumpe kodiert. (Quelle: (35))

In *GBAA0834* konnten zwei Veränderungen festgestellt werden. Dies ist zum einen ein SNP, der eine Veränderung der Aminosäure Threonin in Isoleucin bewirkt, und zum anderen die Insertion eines Nukleotides (C). Diese beiden Veränderungen bedingen eine funktionelle Störung bzw. Inaktivierung des *Tet-Repressors*, welche die erhöhte Transkription der von ihm regulierten Gene *GBAA0832*, *GBAA0833* und *GBAA0835* bewirken kann. Durch eine real-time-PCR konnte diese Hochregulierung der Gene nachgewiesen werden. Des Weiteren haben *Serizawa et al.* (2012) durch Versuche mit Reserpine festgestellt, dass Efflux-Pumpen eine Ursache der Resistenz gegen CIP in den beiden sequenzierten *B. anthracis* Stämmen darstellen, was die Vermutung, dass die drei genannten Gene Efflux-Systeme sind, verstärkt. Diese oder ähnliche Veränderungen der Basensequenz, welche erhöhte Leistungen oder ein erweitertes Substratspektrum von Efflux-Pumpen bewirken, werden auch in dieser Studie als Ursache der Resistenzbildung gegen CIP angenommen.

4.1.2 Resistenz gegen Nalidixinsäure

Die Generierung von NAL-Mutanten wurde durchgeführt, um einen Vergleich der Veränderungen verursacht durch ein Chinolon der ersten Generation mit der Generierung von CIP-Mutanten herzustellen. Den wichtigsten Vergleichspunkt stellte die Frage, ob die gleichen SNPs innerhalb der QRDR bei beiden Mutantengruppen auftreten, dar. Aber auch

4 Diskussion

andere Faktoren, wie die benötigte Zeitspanne für eine Verdopplung des MHK-Wertes, wurden untersucht.

Der MHK-Wert des *B. cereus* WT für NAL lag bei 6 µg/ml. Leider liegen von dem CLSI für das Chinolon NAL keine publizierten Referenzwerte von *B. cereus* vor (43), es wird jedoch angenommen, dass bei diesem Wert bereits eine Resistenz gegen NAL vorliegt. Die drei erzeugten *B. cereus* NAL-Mutanten besaßen abschließende MHK-Werte von > 320 µg/ml NAL. Es wurde somit eine Erhöhung des initialen MHK-Wertes um den Faktor 53,3 erzielt. Die Zeitspanne zum Verdoppeln eines MHK-Wertes war deutlich kürzer als diejenige, welche die CIP-Mutanten benötigten. So konnten die Mutanten jeweils häufig schon nach zweimaliger Anzucht auf der nächsthöher konzentrierten Agar-Platte ausplattiert werden, wogegen die CIP-Mutanten durchschnittlich drei bis fünf Passagen auf einer gleichkonzentrierten Agar-Platte benötigten. Die Ursachen für die schnellere Entwicklung einer erhöhten NAL-Resistenz könnten einerseits in dem hohen primären MHK-Wert des *B. cereus* Wildtyps bestehen, welcher bereits eine niedrige Resistenz gegen NAL nachweist. Denn da bereits eine niedrige Resistenz vorliegt, findet eine gezielte Steigerung dieser leichter statt als bei vorhandener Sensibilität des Erregers. Ein weiterer begünstigender Faktor könnte sein, dass NAL zu den Vertretern der ersten Generation von Chinolonen zählt, bei denen allgemein schneller und häufiger Resistenzen auftreten (32). Das CIP hingegen ist der zweiten und weiter entwickelten Generation zugehörig. Diese Antibiotika erzielen eine bessere Wirkung, erfassen ein breiteres Spektrum an Bakterien und es treten weniger Resistenzen gegen diese auf (32). Dies wurde hier auch durch die eigenen Untersuchungen für *B. cereus* bestätigt.

In zwei der NAL-Mutanten trat jeweils ein SNP auf. Dies ist in der Mutante 1.1 N der SNP 254 C>T im Gen *gyrA*, welcher auch in der CIP-Mutante 1.3 vorkommt. Er tritt ab dem MHK-Wert von 80 µg/ml auf, was einer Erhöhung um den Faktor 13,3 entspricht. Somit scheint dieser SNP bei Fluorochinolonen im Allgemeinen aufzutreten, im Gegensatz zu CIP entstand er bei NAL jedoch erst ab einer stark erhöhten Resistenz. Der

4 Diskussion

zweite SNP in der Mutante 1.2 N wurde bisher in keiner Studie veröffentlicht. Er liegt im Gen *gyrB* an der Stelle 1313 und ist durch einen Basenwechsel von Cytosin zu Thymin gekennzeichnet. Der geringste MHK-Wert, ab welcher der SNP auftritt, liegt bei 40 µg/ml und somit unter desjenigen für den SNP *gyrA* 254C>T.

Da die dritte NAL-Mutante 1.3 N keinen SNP und die beiden anderen jeweils nur einen SNP aufwies, erscheint auch hier die erhöhte Leistung von Efflux-Pumpen als Grundlage für die beziehungsweise als Ursache der Erhöhung der entstandenen Resistenz äußerst wahrscheinlich.

4.1.3 Kreuzresistenz

Mittels Gradientendiffusionstests wurden sämtliche *B. cereus* Mutanten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem zweiten Antibiotikum, gegen welches sie nicht resistent generiert wurden, getestet. Die Ergebnisse sind in der Tab. 23 gelistet.

Alle CIP-Mutanten bis auf eine Ausnahme besaßen MHK-Werte von > 256 µg/ml gegenüber NAL. Die Mutante 1.4 hatte nur einen erhöhten MHK-Wert gegen NAL von 24 µg/ml. Somit waren alle CIP-Mutanten gegen CIP und NAL resistent. Die Ursache der geringeren Erhöhung der NAL-Resistenz der Mutante 1.4 bleibt ungeklärt, da sie sich während der Generierung gleich zu den anderen CIP-Mutanten verhalten hat. Die MHK-Werte gegen CIP der NAL-Mutanten zeigten eine leichte Erhöhung zu dem des *B. cereus* WT um die Faktoren drei und vier. Der ermittelte MHK-Wert in der Mutante 1.1 N, welche den SNP *gyrA* 254C>T besitzt, beweist, dass dieser SNP nur eine sehr geringe Erhöhung des MHK-Wertes, welcher hier sogar noch im empfindlichen Bereich liegt, gegen CIP auslöst. Auch der MHK-Wert in der Mutante 1.2 N, welche den SNP *gyrB* 1313C>T enthält, erhöhte sich nur leicht und in gleichem Maße wie der MHK-Wert der Mutante 1.3 N, die keinen SNP innerhalb der QRDR aufweist. Somit scheinen die SNPs nur eine Möglichkeit für eine Resistenzbildung gegen CIP darzustellen, es muss jedoch ein weiterer und zudem weitaus effektiverer Mechanismus

4 Diskussion

existieren, sehr wahrscheinlich scheint hier die verstärkte Leistung von Efflux-Pumpen wie von *Serizawa et al.* (2010) beschrieben, dieser Resistenz zugrunde liegen.

Die Grundlage für die verschieden starken Erhöhungen der MHK-Werte zwischen CIP- und NAL-Mutanten scheint wiederum die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden Antibiotika darzustellen. So besitzt NAL als ein Vertreter der ersten Generation der Chinolone eine geringere Wirksamkeit und ein engeres Spektrum, sodass es allgemein nur zur Behandlung von gram-negativen Erregern eingesetzt wird, als das weiterentwickelte CIP (32). Eine ähnliche Untersuchung zu Kreuzresistenzen bei *B. anthracis* wurde von *Grohs et al.* (2004) durchgeführt. Dort wurde ein gegen NAL resistenter *B. anthracis* Stamm, welcher den SNP *gyrA254C>T* besaß, resistent gegen CIP generiert und alle Zwischenstufen wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen verschiedener Generationen getestet. Das Ergebnis wird in Tab. 43 dargestellt. Es entsprach der hier dargelegten Vermutung, dass eine Kreuzresistenz zwischen Chinolonen vorkommt. Des Weiteren wurde bestätigt, dass Kreuzresistenzen für Chinolone neuerer Generationen geringere Auswirkungen haben. So zeigten die Resultate von *Grohs et al.* (2004), dass die Kreuzresistenz bei Norfloxacin, einem Fluorochinolon der erste Klasse der zweiten Generation, viel stärker ausgeprägt ist, als bei den Vertretern der dritten Generation (Levofloxacin und Gatifloxacin). Weiterhin wurde gezeigt, dass trotz einer hohen Resistenz gegen CIP, welches der zweiten Klasse der zweiten Generation angehört, die MHK-Werte gegen Garenoxacin, das der vierten Generation zugeordnet wird, im sensitiven bzw. intermediären Bereich liegen. Dies liegt darin begründet, dass die Vertreter der vierten Generation durch ihren leicht veränderten molekularen Aufbau an andere Stellen der Typ II Topoisomerasen binden (31, 32). Somit kann man das Garenoxacin bzw. andere Vertreter der vierten Generation trotz Resistenzen gegen andere Fluorochinolone meist weiterhin anwenden. Gleiche Ergebnisse wurden unter anderem zuvor schon für *S. aureus* und *Staphylococcus pneumoniae* erzielt (49, 50).

Tab. 43: Vergleich MHK-Werte verschiedener Fluorochinolone eines gegen CIP resistent generierten *B. anthracis* Stammes nach Grohs et al. (2004)

MHK-Wert: CIP in $\mu\text{g/ml}$	NOR	OFL	LEV	GAT	GAR
8	16	4	2	1	0,5
16	64	4	2	2	0,5
32	128	8	4	4	0,5
64	≥ 256	8	4	8	1
256	≥ 256	64	32	16	2

NOR= Norfloxacin; OFL= Ofloxacin; LEV= Levofloxacin; GAT= Gatifloxacin;
GAR= Garenoxacin

4.2 MHK-Wert-Bestimmung verschiedener *B. cereus* Stämme

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU München wurde eine Auswahl der *B. cereus* Stammsammlung dieses Instituts auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet. Für diese Arbeit besonders relevant sind die Ergebnisse der Mikrodilutionstests für CIP. Die Auswahl der 93 Stämme beinhaltete Stämme aus Umweltproben, aus klinischen Proben, unter anderem mit emetischer Symptomatik der infizierten Patienten, und Lebensmittelproben sowie Referenzstämme. Es wurde also ein breites Herkunftsspektrum durch die Probenauswahl abgedeckt.

Die Ergebnisse lieferten ein positives Bild, denn sämtliche MHK-Werte gegenüber CIP lagen im sensitiven Bereich ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 43) zwischen $0,063 \mu\text{g/ml}$ und $0,5 \mu\text{g/ml}$ mit dem Hauptanteil von 48 % bei $0,25 \mu\text{g/ml}$, wie in Abb. 12 ersichtlich.

Alle Stämme bis auf eine Ausnahme waren resistent gegen Penicillin. Dies ist kein außergewöhnliches Ergebnis, sondern entspricht den heutigen Erwartungen von MHK-Werten von *B. cereus* (11). So führten auch *Turnbull et al.* (2004) ähnliche Untersuchungen mit 67 verschiedenen *B. cereus* Stämmen mit einem großen Herkunftsspektrum durch, wobei 90 % dieser

4 Diskussion

Stämme MHK-Werte gegenüber Penicillin von $> 32 \mu\text{g/ml}$ besaßen.

Die Untersuchung dieser aussagekräftigen Stammauswahl lässt einen Vergleich mit den allgemein in unserer Region vorkommenden *B. cereus* Stämmen zu. Die allgemeine Resistenzlage zeigt keine Besonderheiten auf, sondern entspricht den Ergebnissen anderer in dieser Hinsicht durchgeführten Studien (52). Des Weiteren scheint die Resistenzlage gegen CIP in *B. cereus* Stämmen momentan niedrig zu sein, sodass eine Therapie einer *B. cereus* Infektion mit CIP eine gute Aussicht auf Erfolg hat.

4.3 synthetische Oligonukleotide

Neben der Nutzung von nahe verwandten Organismen als Ersatz für einen problematischen Zielorganismus ist die Herstellung synthetischer Template-DNA eine weitere Möglichkeit um Mutationskontrollen zu generieren. So trat in der vorliegenden Studie nur der SNP 254C>T im Gen *gyrA* in den generierten *B. cereus* CIP-Mutanten auf. Es wurden daher für die restlichen sieben SNPs andere Mutationskontrollen benötigt. Diese wurden mittels sechs synthetisch hergestellter Oligonukleotide (siehe Tab. 3) dargestellt, welche Längen von 82 – 94 bp besaßen und an sämtlichen acht möglichen SNPs die Mutationsbasen beinhalteten. Nach den ersten Versuchen mit Konzentrationen von 1 pmol/ μl , 0,1 pmol/ μl und 0,01 pmol/ μl stellte sich heraus, dass die Templates ab einer Konzentration von $\leq 0,01$ pmol/ μl auswertbare Ergebnisse erzielten. In jedem Assay waren die Ergebnisse als sehr gut zu bezeichnen, da nur für das FAM Ct-Werte entstanden und die Amplifikationskurven einen optimalen Verlauf aufwiesen.

Im Vergleich mit der Herstellung resistenter Bakterien mittels Gentransfer hat sich die Nutzung der synthetischen Oligonukleotide als erfolgreich bewiesen. Diese Variante ist einfacher, kostengünstiger und in einem deutlich kürzeren Zeitrahmen anzuwenden (53, 54).

Die Nutzung synthetischer Templates als Mutationskontrollen wurde schon zuvor von *Birdsell et al.* (2012) durchgeführt. Jedoch wurden diese hierbei

4 Diskussion

als Amplifikate einer konventionellen PCR hergestellt. Dies gelang, indem ein Forward-Primer eingesetzt wurde, welcher am 3'-Ende den SNP in Form der Mutationsbase enthielt. Da nur ein *mismatch* vorlag, konnte der Primer trotzdem an die Probe anbinden, sodass die Amplifikate mit der Mutationsbase ausgestattet worden (42). Diese Variante zur Herstellung synthetischer Mutationskontrollen ist kostengünstiger als die Vollsynthese durch einen kommerziellen Anbieter. Jedoch ist sie zugleich aufwendiger und benötigt eine weit längere Zeitspanne, da nach der Synthese der Primer erst eine konventionelle PCR und anschließend eine Aufreinigung und Kontrolle, z. B. eine Gelelektrophorese, der PCR-Produkte durchgeführt werden muss. Somit ist letztlich die Vollsynthese der künstlichen Mutationskontrollen durch einen kommerziellen Anbieter als die Methode der Wahl für die Nutzung solcher Assays in der Diagnostik zu sehen.

4.4 Entwicklung Schnelltests

Das Ziel der Entwicklung der Schnelltests lag in der Präsentation einer PCR-Methode, welche innerhalb von zwei Stunden nach der Diagnose Milzbrand eine sichere Aussage hinsichtlich der CIP-Empfindlichkeit des Erregers treffen kann. Dieses Ziel wurde unter der Bedingung eingehalten, dass die Ursache einer Resistenz gegen CIP in Mutationen innerhalb der QRDR liegt.

Die Tab. 1 zeigt alle in der Literatur beschriebenen Resistenz auslösenden SNPs innerhalb der QRDR. Dies sind neun SNPs. Es wurden jedoch nur Assays für acht SNPs entwickelt. Dies liegt darin begründet, dass der SNP *gyrB* 1309G>A, welcher von *Price et al.* (2003) im Rahmen eines stark erhöhten MHK-Wertes beschrieben wird, in der Recherche für diese Arbeit so nicht vorkommen kann. Sämtliche untersuchte *B. anthracis* Stämme, unter anderem der *B. anthracis* Ames Ancestor, besitzen an dieser Stelle im Gen die Base Thymin statt einem Guanin wie bei *Price et al.* (2003) inkorrekt beschrieben (37). Aufgrund dieser Problematik konnte kein Assay für diesen SNP hergestellt werden.

4 Diskussion

4.4.1 MeltMAMA

Die ersten Versuche für die Entwicklung der Schnelltests wurden mit der real-time-PCR-Methode MeltMAMA durchgeführt. Durch das einfache und vielseitig nutzbare Prinzip des MeltMAMA ist diese PCR-Technik an vielen Geräten anzuwenden und hat eine sehr kurze Durchführungsdauer von nur einer Stunde. Zudem ist diese Technik, für eine real-time-PCR-Methode, sehr kostengünstig und ca. 14 x günstiger als TaqMan (42). Aus diesen Gründen wurde MeltMAMA zu Beginn der Arbeit favorisiert.

Es scheiterten jedoch alle Versuche MeltMAMA-Assays für die gesetzte Aufgabenstellung zu entwickeln. Laut *Birdsell et al.* (2012) liegt die Fehlerrate in der Entwicklung von MeltMAMA-Assays bei rund 50 %. Die Ursachen hierfür sind vor allem Fehler im Design der Assays durch unzureichendes Wissen über das Prinzip des MeltMAMA. Deswegen erstellten *Birdsell et al.* (2012) ein Schema, in welchem die beste Vorgehensweise für die Erstellung eines Assays dargestellt wird (siehe Abb. 38). Dieses Schema wurde im Rahmen dieser Arbeit als Vorlage genutzt, jedoch führte diese Nutzung zu keiner Verbesserung der Assays.

4 Diskussion

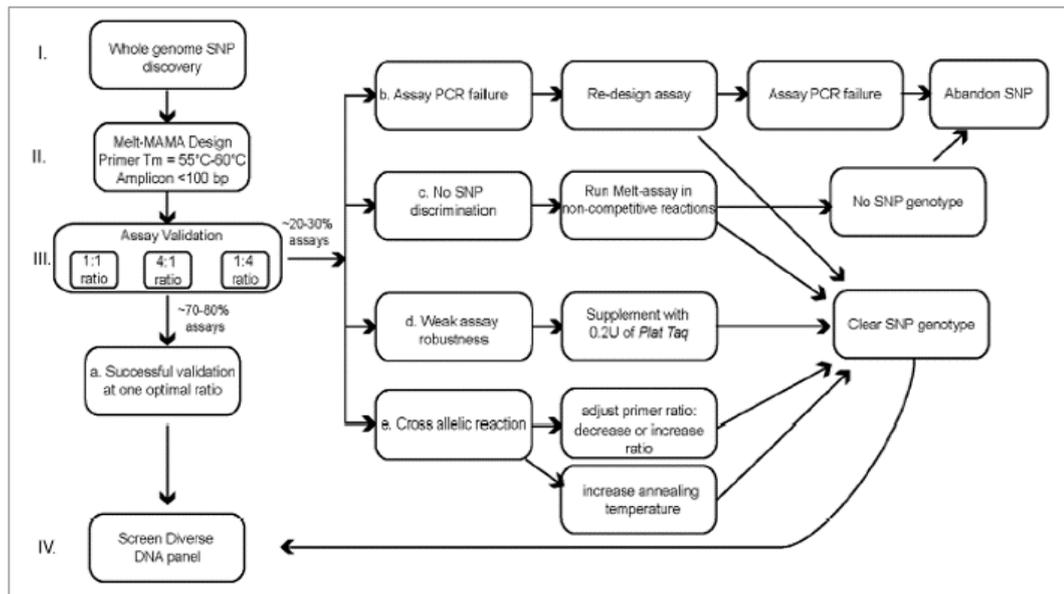


Abb. 38: Vorgehensweise während Entwicklung eines MeltMAMA-Assays. Es werden die Schritte aufgeführt, nach denen man vorgeht, um ein optimal funktionierendes Assay zu entwickeln, welches SNPs nachweisen kann. (Quelle: (42))

Im ersten Schritt der Abb. 38 steht die genaue Analyse des Genoms und des SNPs, der nachgewiesen werden soll (I). Das Gesamtgenom und der GC-Gehalt besitzen hier eine gewisse Bedeutung, denn je größer das Genom und je höher der GC-Gehalt umso schlechter ist die Erfolgsrate eines MeltMAMA-Assays. *B. anthracis* besitzt ein Gesamtgenom von 5,2 Mb und einen GC-Gehalt von 35 % (42, 44). Diese beiden Parameter liegen im mittleren Durchschnitt, was zu einer Erfolgsrate von 83 – 100 % resultieren würde (42) und somit nicht als Ursache des Scheiterns innerhalb dieser Studie angesehen werden kann. In der Beobachtung der relevanten SNPs hingegen fiel auf, dass einige dieser sehr nah beieinander lagen. Dadurch konnte nicht verhindert werden, dass in wenigen Fällen eventuelle *mismatches* in den *Forward* Primern oder dem *Reverse* Primer entstanden, welche eine Amplifikation während der PCR verhinderte. Dieses Problem trat bei dem Design des MeltMAMA-Assays für den SNP *gyrA266A>G/C* auf und wird als Hauptursache des Scheiterns dieses Assays angenommen.

Der zweite Schritt besteht aus dem Design der Primer, welche eine Schmelztemperatur von ca. 55 °C besitzen sollten, sodass Amplifikate von

4 Diskussion

60 – 100 bp entstehen (II.). Auch dieser Schritt konnte bei einigen SNPs nicht eingehalten werden. So konnten unter anderem bei den SNPs *parC242C>T/A* und *parC244T>C* die Primer jeweils aufgrund des fast direkt angrenzenden SNPs nur in eine Richtung entlang des Genoms erstellt werden. Das Erstellen von Primern mit optimalen Schmelztemperaturen wurde so unter anderem aufgrund zu hoher GC-Gehalte oder zu hoher Komplementarität zu sich selbst oder dem anderen Primer verhindert, sodass die Schmelztemperaturen höher als 55 °C waren und in einem Bereich zwischen 58 °C und 60 °C lagen. Alternativ wurden durch die gewünschten Schmelztemperaturen der Primer die Amplifikate länger und enthielten bis zu 130 bp. Eine Differenz der Schmelztemperaturen der beiden Amplifikate von mind. 3 °C ist Voraussetzung für eine zuverlässige Zuordnung der Amplifikate. Um diese Differenz zu gewährleisten sollten die Amplifikate eine Länge von 80 - 90 bp besitzen (42). Dabei liegen die Schmelztemperaturen optimaler Weise in einem Bereich zwischen 80 °C und 85 °C. Der *GC-clamp* des Mutations-*Forward* Primers muss zusätzlich eine Erhöhung der Schmelztemperatur dieses Amplifikates um ca. 5 °C bewirken, damit der Unterschied zwischen beiden Amplifikaten deutlich zu erkennen ist. Diese Erhöhung um ca. 5 °C entsteht jedoch nur, wenn die Amplifikate eine bestimmte Länge und Schmelztemperatur nicht überschreiten, was jedoch bei den Assays für die SNPs *parC242C>T/A* und *parC244T>C* nicht verhindert werden konnte. Dadurch bewirkt der *GC-clamp* in diesen beiden Assays nur eine sehr geringe Erhöhung der Schmelztemperatur, welche eine zuverlässige Zuordnung der entstandenen Amplifikate zu WT oder Mutation verhindert.

Im folgenden dritten Schritt des Melt-MAMA-Schemas (siehe Abb. 38) werden erste Versuche durchgeführt mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zwischen den beiden Forward Primern (III.). Dies wurde für die Assays der SNPs *gyrA254C>T*, *parC242C>T/A*, *parC244T>A* und *parC253G>A* ausgeführt.

70 - 80 % der Assays zeigen laut *Birdsell et al.* (2012) nach diesen Versuchen erste Erfolge und bedürfen nur noch leichter Veränderungen

4 Diskussion

(a.). Erfolge zeigte im Rahmen dieser Arbeit nur der Assay für den SNP *gyrA254C>T*. Das Verhältnis von 4:1 der beiden Forward-Primer begünstigt den WT-Forward-Primer, welcher ein schlechteres Bindungsvermögen an WT-Kontrollen aufwies, sodass gute Ergebnisse erzielt werden können. Durch Veränderungen des MgCl₂-Gehaltes von 3 mM auf 4 mM konnten die Ergebnisse dieses Assays für den *B. cereus* weiter optimiert werden.

20 – 30 % der Assays jedoch weisen nach den ersten Versuchen laut *Birdsell et al. (2012)* keine auswertbaren Ergebnisse auf und müssen weiterentwickelt werden. In dieser Studie waren es 87,5 %. Die Ursachen können im Scheitern der PCR (b.), im nicht möglichen Zuordnen der Amplifikate anhand der Schmelzkurven (c.), einer schlechten Assay Robustheit (d.) oder einer Kreuzreaktion der Primer und Proben (e.) liegen. Für die Assays der drei SNPs im Gen *parC* lagen c. und e. als Hauptursachen vor. Hierbei konnte das Problem der Kreuzbindung durch eine Senkung der Annealingtemperatur auf 55 °C verbessert werden. Weiterhin zeigten Versuche mit jeweils nur der WT-Kontrolle oder der M-Kontrolle und anschließender Gelelektrophorese, dass bei den drei Assays jeweils nur der passende Forward-Primer an die Probe binden konnte, dabei jedoch für beide Amplifikate trotz des GC-clampes am M-Forward-Primer sehr nah beieinander liegende Schmelztemperaturen entstanden, welche eine Differenzierung zwischen WT und M unmöglich machten. Als Ursache hierfür werden zu große Amplifikate, wie bereits bei Schritt 2 (II.) beschrieben, vermutet, da bei diesen der GC-clamp nur eine sehr geringe Erhöhung < 1 °C der Schmelztemperatur des einen Amplifikates bedingt.

Kreuzreaktionen zwischen Probe und Primer können durch Abweichungen in der Basenfolge, insbesondere nahe des 3'-Endes der Forward-Primer, bedingt sein. Diese können das Anbinden des falschen Forward-Primers begünstigen. So findet zwar eine Amplifikation statt, dabei entsteht jedoch entweder das falsche Amplifikat oder ein Mix aus beiden möglichen Amplifikaten, sodass in der Auswertung in beiden Fällen ein falsches beziehungsweise kein Ergebnis entsteht.

Ein Assay für den SNP *gyrA 256C>T* wurde entwickelt. Jedoch funktioniert

4 Diskussion

er nur für *B. cereus* Stämme, welche zuverlässig in Wildtyp- oder Mutationsvariante eingeteilt werden. *B. anthracis* Proben hingegen werden nicht amplifiziert. Zu viele Differenzen der Basen, welche in der Region der Primer liegen, zwischen *B. cereus* und *B. anthracis* wurden als Ursache hierfür angenommen. Ein direkter Vergleich dieser Basen zwischen *B. cereus* ATCC109897 und *B. anthracis* Ames Ancestor hat eine Differenz in der Region des *mismatches* der Forward-Primer sowie eine weitere Differenz in der Region der Reverse-Primer aufgeführt und die vermutete Ursache dadurch bestärkt.

4.4.2 TaqMan

Als zweite Variante zur Assay-Entwicklung wurde die real-time PCR Technik TaqMan getestet. Sie erwies sich unter anderem durch die einfache Durchführung, die Möglichkeit der Anwendung an verschiedenen Geräten und die kurze Dauer von 1,5 Stunden als Methode der Wahl. Es wurden für alle acht SNPs (siehe Tab. 1) Assays entwickelt.

Es wurden zuvor im Rahmen anderer Studien bereits ähnliche Schnelltests hergestellt. Diese weisen alle Resistenzen gegen Fluorochinolone für einige andere Erreger nach. So haben *Kim et al.* (2012) multiplex real-time PCR Techniken für *Escherichia coli* und *Shigella* Spezies entwickelt (55). Mittels dieser wurden jeweils zwei SNPs, die Resistenzen gegen CIP verursachen, im Gen *gyrA* oder *parC* nachgewiesen. Es wurden nur Sonden für den Wildtyp entwickelt, sodass Fluoreszenzsignale in der Auswertung der PCR nur sensitive Stämme kennzeichneten. Keine messbare Fluoreszenz hingegen entstand bei resistenten Stämmen, welche einen oder beide der SNPs enthielt. In der Studie von *Lapierre et al.* (2003) wurden Schnelltests für den Nachweis von zwei SNPs im Gen *parC* bei *S. aureus* entwickelt (56). Diese beiden SNPs treten allgemein bei einer Resistenz gegen Fluorochinolone in *S. aureus* zuerst auf. Für die Schnelltests wurden drei Sonden, an welche ein Fluorophor gekoppelt war, hergestellt. Die ersten beiden Sonden enthielten jeweils einen SNP, das heißt eine der beiden

4 Diskussion

Mutationsbasen. Die dritte Sonde enthielt eine Sequenz, welche innerhalb der beiden Primer lag und somit das Ergebnis, ob die Probe ein *S. aureus* Stamm ist oder nicht, lieferte. Dieser Test weist somit primär die Zugehörigkeit der Probe zu *S. aureus* nach und gibt gleichzeitig Auskunft ob SNPs vorliegen und eine Resistenz gegen Fluorochinolone vorhanden ist.

Die beiden Studien *Kim et al. (2012)* und *Lapierre et al. (2003)* nutzten somit wie die vorliegende Arbeit fluoreszenzbasierte real-time PCR Techniken für die Entwicklung von Schnelltests zum Nachweis von Resistenzen gegen CIP. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten die anderen Schnelltests jedoch nur wenige SNPs von vielen bekannten SNPs nachweisen. Durch den Vergleich der Mechanismen und Auswertungsmöglichkeiten der jeweiligen PCR konnten die Schnelltests dieser Studie und diejenigen von *Lapierre et al. (2003)* als die besseren und somit als Methoden der Wahl festgelegt werden.

4.4.2.1 Auswertung

Eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse anhand der Ct-Werte und der Amplifikationskurven war bis auf wenige Ausnahmen, Negativproben betreffend, problemlos möglich.

Die Assays TM_gyrA254, TM_parC242 und TM_parC244 lieferten für die Wildtypkontrollen jeweils Ct-Werte für das HEX und das FAM. Es banden hier, wie in 3.6.1, 3.6.6 und 3.6.7 ersichtlich, weit weniger Sonden der Mutationsbasen an die Negativproben, sodass eine Zuordnung zum HEX durch die Differenz von ca. drei zwischen beiden Ct-Werten und einem flacheren Anstieg der Fluoreszenzstärke des falschen Fluorophors möglich war. Jedoch wurde die Auswertung dieser Assays für die Negativproben dadurch geringfügig erschwert. Die restlichen Assays lieferten, durch alleinige Ct-Werte für das HEX, optimale Ergebnisse und somit eine eindeutige und einfache Auswertung der Negativproben.

4 Diskussion

Auch bei *Kim et al.* (2012) und *Lapierre et al.* (2003) verlief die Auswertung ähnlich und konnte gleich einfach und mit eindeutigem Ergebnis durchgeführt werden. Die Auswertung bei *Lapierre et al.* (2003) wird in der Abb. 39 dargestellt.

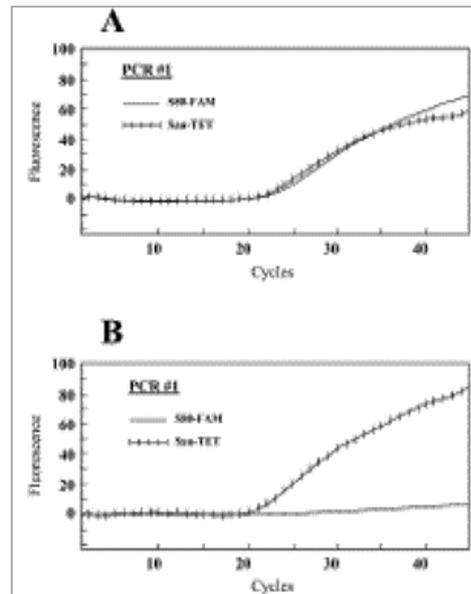


Abb. 39: Auswertung Schnelltest von *Lapierre et al.* (2003). (A) weist eine Wildtypprobe und (B) eine Mutantenprobe nach. Die gestrichelte Linie zeigt die gemessene Fluoreszenz der Sonde, welche *S. aureus* nachweist. Sie steigt sowohl bei (A) als auch bei (B) an und definiert beide Proben als *S. aureus* Stämme. Die durchgezogene Linie zeigt die gemessene Fluoreszenz der Sonde, welche die Wildtypbase des SNPs Ser80>Phe/Tyr besitzt. Diese steigt nur bei (A) an und kennzeichnet diese Probe als Wildtypprobe. (B) wird dadurch als Mutantenprobe definiert. (Quelle: (56))

4.4.2.2 Sensitivität und Spezifität

Es wurden die optimalen Konzentrationen, welche die besten Ergebnisse erzielten, sowie die Mindestkonzentrationen, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten, der Proben ermittelt.

Die optimalen Konzentrationen lagen für die Wildtypkontrollen und die *B. cereus* Mutationskontrollen zwischen 10^3 – 10^4 Kopien/ μ l. Die Mutationskontrollen, welche von den synthetischen Templates dargestellt wurden, hatten optimale Konzentrationen im Bereich 100 bis 1 Kopie(n)/ μ l.

4 Diskussion

Proben dieser Konzentrationen erzielen Ct-Werte zwischen 22 – 30 und weisen typische Amplifikationskurven auf. Diese Konzentrationen zu erreichen, stellt bei klinischen Proben keinerlei Probleme dar, da in der Regel eine massive Vermehrung von *B. anthracis* innerhalb des befallenen Organismus stattfindet. So sind bei infizierten Rindern ca. 10^8 Bakterien/ml in Blut oder Exsudat vorhanden (8).

Die untere Nachweisgrenze konnte für alle *B. cereus* und *B. anthracis* Kontrollproben auf ca. 10 Kopien/ μ l festgelegt werden. Für diese Konzentrationen entstanden Ct-Werte von > 39 und die Amplifikationskurven wiesen nur einen beginnenden Anstieg auf. Somit ist für Proben solch niedriger Konzentrationen eine Zuordnung zu Wildtyp oder Mutation möglich, jedoch kann diese aufgrund der Höhe des Ct-Wertes besonders im Vergleich zu den stattfindenden 40 Zyklen fragwürdig erscheinen. Auch *Lapierre et al.* (2003) konnten die minimal einzusetzende Konzentration auf 10 Kopien/ μ l festlegen.

Versuche mit anderen *Bacillus* spp. zeigen, dass die Assays generell ausschließlich für *B. anthracis* anwendbar sind. Neunundzwanzig (96,67 %) der 30 untersuchten *B. anthracis* Stämme erzielten optimale Ergebnisse. Der Stamm *B. anthracis* Italien wurde in den beiden Assays TM_gyrB1408 sowie TM_gyrB1428 nicht amplifiziert. Als Ursache dafür wurden zu viele Unterschiede der Basensequenzen innerhalb der jeweiligen Primersequenzen angenommen. Da keine Gesamtgenomsequenzierung dieses Stammes vorlag, konnte man diese Vermutung aber leider nicht bestätigen. Auch *Kim et al.* (2012) führten Versuche mit 48 *E. coli* Stämmen und 14 *Shigella* Spezies durch und konnten so eine Sensitivität von 100 % festlegen. Der Schnelltest von *Lapierre et al.* (2003) besaß eine Sensitivität von 98,8 %. Die hier entwickelten Schnellteste besitzen im Vergleich somit die niedrigste, wenn auch trotzdem sehr hohe, Sensitivität. Jedoch ist die Differenz zu den 100 % durch eine Nichtamplifikation eines Stammes verursacht. Bei *Lapierre et al.* (2003) hingegen wurde die Senkung durch falschnegative Resultate ausgelöst, welche in der Klinik weitaus schlimmere Folgen bedingen können.

4 Diskussion

Die anderen *Bacillus* spp. wurden in den verschiedenen Assays nur teilweise amplifiziert. Durch Vergleiche der Basensequenzen der drei Gene *gyrA*, *gyrB* und *parC* konnten verschieden starke Abweichungen in der Basenfolge als Ursache für die Unterschiede in der Funktionalität der Assays determiniert werden. Auch der von *Lapierre et al.* (2003) entwickelte Schnelltest konnte nur für *S. aureus* genutzt werden. *Kim et al.* (2012) hingegen haben Schnellteste hergestellt, welche ein breiteres Spektrum umfassten und für verschiedene *Shigella species* und *E. coli* eingesetzt werden konnten. Im Hinblick auf die gesetzte Zielsetzung dieser Arbeit ist dies jedoch nicht von weiterführender Relevanz, da die Schnelltests nur für *B. anthracis*, der durch jeden der acht Assays zuverlässig hinsichtlich seiner Resistenzlage gegenüber CIP eingeteilt wird, entwickelt wurde.

4.5 Einsatz des Schnelltests in der Diagnostik

Die momentane Resistenzlage von *B. anthracis* hinsichtlich CIP zeigt, dass kaum Resistenzen auftreten. Jedoch hat diese Arbeit gezeigt, dass sich eine Resistenz in vivo und in vitro sehr einfach und schnell entwickeln kann. Daher ist eine Untersuchung hinsichtlich der CIP-Resistenz von *B. anthracis* im klinischen Fall von großer Bedeutung. Die aktuell verfügbaren Standards der Untersuchungsmethoden, wie der Gradientendiffusions- oder der Mikrodilutionstest, haben den großen Nachteil, dass eine vorherige kulturelle Anzucht notwendig ist und dass ihre Durchführung ca. 24 Stunden benötigt. Daraus resultiert eine minimale Durchführungsdauer von zwei Tagen (36). Dies kann besonders im schwerwiegenden Verlauf von Lungenmilzbrand, welcher bei einem Einsatz von CIP-resistenten *B. anthracis* als biologischen Kampfstoff am wahrscheinlichsten ist, den Tod vieler Patienten zur Folge haben (1).

Der entwickelte Test benötigt für dessen Durchführung ein Gerät, welches kompatibel für die Durchführung eines TaqMan ist, einen TaqMan MasterMix sowie *B. anthracis* DNA der klinischen Probe mit einer Konzentration von mind. 10 Kopien/µl. Die ersten beiden Punkte können in

4 Diskussion

jedem Labor, welches mit *B. anthracis* arbeiten darf, vorausgesetzt werden. Die benötigte Menge an DNA stellt aufgrund der massiven Vermehrung des Erregers im Patienten keine Herausforderung dar. Somit gestaltet sich eine mögliche Durchführung des Tests im klinischen Fall problemlos.

Für die Anwendung des Schnelltests wird empfohlen zuerst den Assay für den SNP *gyrA254* C>T durchzuführen, denn dieser SNP wird in allen Studien als der primär auftretende SNP beschrieben (26, 27, 34, 35, 48). Für die anderen sieben Assays wird keine Präferenz für die Reihenfolge des Ablaufs empfohlen. Die acht Assays sollten jedoch komplett durchgeführt werden, da es nicht ausgeschlossen werden kann, dass jeder dieser SNPs einzeln auftreten und eine Resistenz gegen CIP bedingen könnte. Durch den Nachweis eines oder mehrerer der acht SNPs sollte man von einer verminderten Sensibilität oder Resistenz gegen CIP ausgehen und die Therapie durch ein anderes Antibiotikum, empfohlen wird Doxycyclin als zweites Antibiotikum der Wahl, fortführen.

Da der Schnelltest SNPs innerhalb der QRDR nachweist, welche nur eine Möglichkeit der Ursache einer CIP-Resistenz darstellen, sollte man die aktuellen Standards der Resistenztests zusätzlich durchführen. Erst dadurch kann eine CIP-Resistenz bei *B. anthracis* endgültig ausgeschlossen werden. Jedoch stellen diese SNPs die Hauptursache einer CIP-Resistenz bei *B. anthracis* dar. Deshalb wird eine Durchführung des Testes in jedem Milzbrandfall empfohlen, da dadurch eine falsche Therapie mittels CIP innerhalb von nur zwei Stunden nach der Diagnose erkannt und durch eine optimale Therapie mit einem anderen Antibiotikum ersetzt werden kann.

II ZUSAMMENFASSUNG

Die gebräuchliche Therapie gegen Milzbrand besteht aus der Gabe von Antibiotika. Als Therapie der Wahl gilt hierbei das Fluorochinolon Ciprofloxacin. Resistenzen gegen dieses Antibiotikum wurden bei *B. anthracis in vivo* noch nicht, *in vitro* jedoch im Rahmen mehrerer Studien beschrieben. Es existieren herkömmliche Resistenztests, wie der Gradientendiffusions- oder der Mikrodilutionstest, welche bei einer Milzbranderkrankung genutzt werden können. Diese nehmen jedoch aufgrund der kulturellen Anzucht in einem Labor der Schutzstufe 3 vor der Durchführung des Tests ein bis zwei Tage Zeit in Anspruch. Um diese Zeitspanne zu verkürzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Schnelltests entwickelt. Diese basieren auf einer real-time-PCR Methode, mit welcher Ciprofloxacin-Resistenz verursachende Punktmutationen (= SNPs), nachgewiesen werden.

Im ersten Abschnitt dieser Studie wurde der *B. cereus* Stamm ATCC10987 resistent gegen Ciprofloxacin generiert. Aufgrund der *Dual-Use-Research-of-Concern*-Problematik wurde dieser, wenig pathogene, aber genotypisch sehr nah mit *B. anthracis* verwandte, BSL-2-Organismus verwendet. Die Resistenzbildung erfolgte durch natürliche Selektion, indem der *B. cereus* Wildtyp mehrfach auf Ciprofloxacin-haltigen Agar-Platten, welche eine steigende Konzentration des Antibiotikums enthielten, angezüchtet wurde. Es folgte eine Sequenzierung der Quinolone Resistance Determining Region (= QRDR), bestehend aus den Genen *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*, von neun *B. cereus* Mutanten, welche CIP-Resistenzen entwickelt hatten. Eine der Mutanten besaß einen SNP im Gen *gyrA* an Stelle 254 mit einer Mutation der Base Cytosin in ein Thymin. Solche SNPs stellen eine mögliche Ursache der Resistenz gegen Fluorochinolone dar. Acht der *B. cereus* Mutanten besaßen jedoch keine SNPs in der QRDR. Die Ursache für deren Resistenz wird in der erhöhten Funktion von Effluxpumpen vermutet.

Im zweiten Teil der Studie wurden die Schnelltests entwickelt. Es wurden

II Zusammenfassung

mehrere Protokolle für die beiden real-time-PCR Methoden TaqMan® und MeltMAMA (= Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays) erstellt und getestet. Der Vergleich beider Methoden wertete den TaqMan® als die Methode der Wahl für die gesetzte Zielstellung. Daraufhin wurden für acht bekannte Ciprofloxacin-Resistenzen auslösende SNPs TaqMan®-Protokolle entwickelt. Im Abschluss wurden diese durch Versuche mit verschiedenen *B. anthracis* Stämmen, dem *B. cereus* ATCC10987 Wildtyp und seinen Mutanten, synthetisch hergestellten Templates, die als Mutationskontrollen genutzt wurden, sowie verschiedenen *Bacillus* Spezies hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität erprobt.

Es wurden acht TaqMan® Protokolle erarbeitet, welche SNPs in der QRDR von *B. anthracis* nachweisen und somit eine schnelle Diagnose vieler Ciprofloxacin-resistenter Stämme gewährleisten. Der Einsatz dieser Schnelltests zusätzlich zu den herkömmlichen Empfindlichkeitstests gibt die Möglichkeit eine optimale Therapie von Milzbrandinfektionen in einem verkürzten Zeitraum zu gewährleisten.

III SUMMARY

Common therapy against anthrax typically is based on the antibiotic ciprofloxacin, a fluoroquinolone. Resistances against these gyrase-inhibitors may occur in this Gram-positive bacterium and have been described in the literature. To test for resistances in a *B. anthracis* strain from patients with acute anthrax infections resistance-assays such as the antimicrobial diffusion gradient or micro-dilution methods are applied. However, these kinds of culture-dependent diagnostics require up to two days for completion. Therefore, we developed a more rapid method involving eight real time PCR assays to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) leading to resistance against ciprofloxacin in *B. anthracis*.

Because of dual-use issues associated with *B. anthracis* being a BSL-3 organism we created ciprofloxacin resistant strains utilizing the less pathogenic, very close relative species *B. cereus* ATCC10987. DNA-sequences especially of the fluoroquinolone resistance determining (gene) regions (QRDR) are highly conserved among *B. cereus* and *B. anthracis*. *B. cereus* ATCC10987 which is a BSL2-pathogen was made ciprofloxacin-resistant via natural selection of resistant strains by cultivating the bacteria on agar plates containing increasing concentrations of ciprofloxacin. We identified SNPs in the QRDR of gyrase and type IV topoisomerase genes. These QRDR comprise the genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* which represent the targets of ciprofloxacin. Mutations in these genes are known to cause resistance against ciprofloxacin. Some of the mutants did not contain such SNPs. Efflux-pumps are assumed to be the source of their resistance.

In the development of the diagnostic PCR-assays the two real time methods, (i) TaqMan[®] or (ii) Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (MeltMAMA) were tested. TaqMan[®] proved to be the method of choice after comparison. TaqMan[®]-assays for the SNPs were

III Summary

developed. Finally these assays were performed with different *B. anthracis* strains, the *B. cereus* ATCC10987 wildtype, the selected mutants and synthetic templates used as mutation-control to determine sensitivities and specificities.

Eight TaqMan®-assays, which detect SNPs in the QRDR of *B. anthracis*, were developed. They ensure a quick identification of many ciprofloxacin-resistant strains. The additional use of these rapid tests in addition to the common resistance-assays enable an optimal therapy of anthrax in a shorter period of time.

IV Literaturverzeichnis

IV LITERATURVERZEICHNIS

1. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2002;287(17):2236-52.
2. Klee S, Jacob D, Nattermann H, Appel B. Bioterroristisch relevante bakterielle Erreger. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 2003;46(11):935-48.
3. Hicks CW, Sweeney DA, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive care medicine*. 2012;38(7):1092-104.
4. Grunow R, Verbeek L, Jacob D, Holzmann T, Birkenfeld G, Wiens D, et al. Injection Anthrax—a New Outbreak in Heroin Users. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2012;109(49):843.
5. Grunow R, Klee S, Beyer W, George M, Grunow D, Barduhn A, et al. Anthrax among heroin users in Europe possibly caused by same *Bacillus anthracis* strain since 2000. *Euro surveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*. 2013;18(13).
6. Price EP, Seymour ML, Sarovich DS, Latham J, Wolken SR, Mason J, et al. Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, Europe. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(8):1307.
7. Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Moore GE, Greene CE, editors: Elsevier Science Health Science Division; 2006.

IV Literaturverzeichnis

8. Bakteriologie/Mykologie-Skript des Skriptenvereins der tiermed. Fakultät der LMU München. In: München L, editor.
9. Robert A. Anthrax Bioterrorism: Prevention, Diagnosis and Management Strategies. Journal of Bioterrorism & Biodefense. 2011.
10. Prevention CfDC. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases: The Pink Book: Public Health Foundation; 2007.
11. Kekule. Hochpathogene Erreger – Biologische Kampfstoffe. 1. Beyer W, Bartling C, Neubauer H, editors. München: Elsevier; 2008.
12. Neumeister B, Geiss HK, Braun R. Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. Beyer W, editor: Thieme; 2009.
13. Pilo P, Frey J. Bacillus anthracis: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. Infection, Genetics and Evolution. 2011;11(6):1218-24.
14. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for Bacillus anthracis. Molecular and cellular probes. 2008;22(5):313-5.
15. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie: Thieme; 2009.
16. Ramsay C, Stirling A, Smith J, Hawkins G, Brooks T, Hood J, et al. An outbreak of infection with Bacillus anthracis in injecting drug users in Scotland. Euro Surveill. 2010;15(2).
17. Powell AG, Crozier JE, Hodgson H, Galloway DJ. A case of

IV Literaturverzeichnis

septicaemic anthrax in an intravenous drug user. BMC Infectious Diseases. 2011;11(1):21.

18. Tierseuchengesetz, (1909).

19. Diseases ISfl. www.promedmail.org 2010.

20. Anderson PD, Bokor G. Bioterrorism: pathogens as weapons. Journal of Pharmacy Practice. 2012;25(5):521-9.

21. Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. Science. 1994;266(5188):1202-8.

22. Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen, (2013).

23. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, (1991).

24. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (2000).

25. Potschka H. Pharmakologie und Toxikologie: Antibakterielle Therapie. In: München L, editor. München2009.

26. Price LB, Vogler A, Pearson T, Busch JD, Schupp JM, Keim P. In Vitro Selection and Characterization of Bacillus anthracis Mutants with High-Level Resistance to Ciprofloxacin Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(7):2362-5.

27. Antwerpen MH, Schellhase M, Ehrentreich-Förster E, Bier F, Witte

IV Literaturverzeichnis

W, Nübel U. DNA microarray for detection of antibiotic resistance determinants in *Bacillus anthracis* and closely related *Bacillus cereus*. Molecular and cellular probes. 2007;21(2):152-60.

28. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. Antimicrobial Agents and chemotherapy. 2001;45(10):2877-84.

29. H. C, Selim C, Bouhaouala S, Brook I, Elliott TB, Knudson GB. In Vitro Development of Resistance to Ofloxacin and Doxycycline in *Bacillus anthracis* Sterne. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 2000;44(6):1766.

30. Brook I, Elliott TB, II HIP, Sautter TE, Gnade BT, Thakar JH, et al. In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001;18:559-62.

31. Aldred KJ, McPherson SA, Wang P, Kerns RJ, Graves DE, Turnbough Jr CL, et al. Drug interactions with *Bacillus anthracis* topoisomerase IV: biochemical basis for quinolone action and resistance. Biochemistry. 2011;51(1):370-81.

32. Class I, Ciprofloxacin OF, Sparfloxacin LL, Moxifloxacin GT. Quinolones: a comprehensive review. Am Fam Physician. 2002;65(3):455-65.

33. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine III HS, Wasieloski LP, et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe™, High Resolution Melt and Pyrosequencing™ nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. Molecular and cellular probes. 2010;24(3):154-60.

IV Literaturverzeichnis

34. Bast DJ, Athamna A, Duncan CL, de Azavedo JC, Low DE, Rahav G, et al. Type II topoisomerase mutations in *Bacillus anthracis* associated with high-level fluoroquinolone resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;54(1):90-4.
35. Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, et al. Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(7):2787-92.
36. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49:1749-55.
37. Ravel J, Jiang L, Stanley ST, Wilson MR, Decker RS, Read TD, et al. The Complete Genome Sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". *Journal of Bacteriology*. 2008;191(1):445-6
38. Sterne M. The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind*. 1939;13:307-12.
39. Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Bruce D, et al. Pathogenomic Sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 2006;188(9):3382-90
40. Bierbaum G, Sass P, Berscheid A. www.ag-bierbaum.de.
41. Neumeister B, Geiss HK, Braun R. *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. Schalasta G, editor: Thieme; 2009.

IV Literaturverzeichnis

42. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PloS one*. 2012;7(3):e32866.
43. Cockerill F. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
44. Rasko DA, Ravel J, Okstad OA, Helgason E, Cer RZ, Jiang L, et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pX01 *Nucleic Acid Research*. 2004;32(3):977-88.
45. Medicine NLo. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 2009.
46. Sharma NK, Garg R, Baliga S, K. GB. Nosocomial Infections and Drug Susceptibility Patterns in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(10):2178-80.
47. Joseph NM, Devi S, Shashikala P, Kanungo R. Changing Trend in the Antibiotic Resistance Pattern of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Wound Swabs of Out-Patients and in-Patients of a Tertiary Care Hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2013;7(10):2170.
48. Grohs P, Podglajen I, Gutmann L. Activities of different fluoroquinolones against *Bacillus anthracis* mutants selected in vitro and harboring topoisomerase mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(8):3024-7.

IV Literaturverzeichnis

49. Takahata M, Yonezawa M, Kurose S, Futakuchi N, Matsubara N, Watanabe Y, et al. Mutations in the *gyrA* and *griA* genes of quinolone-resistant clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996;38(3):543-6.
50. Hashem RA, Yassin AS, Zedan HH, Amin MA. Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;7(11):796-803.
51. Ng E, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(6):1345-55.
52. Turnbull PC, Sirianni NM, LeBron CI, Samaan MN, Sutton FN, Reyes AE, et al. MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3626-34.
53. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. *Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie: mit Virologie, Immunologie*: Elsevier Health Sciences Germany; 2013.
54. Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(7):3345-51.
55. Kim J, Jeon S, Kim H, Park M, Kim S, Kim S. Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Method for the Rapid Detection of *gyrA* and *parC* Mutations in Quinolone-Resistant *Escherichia coli* and *Shigella*

IV Literaturverzeichnis

spp. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2012;3(2):113-7.

56. Lapierre P, Huletsky A, Fortin V, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, et al. Real-time PCR assay for detection of fluoroquinolone resistance associated with *griA* mutations in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):3246-51.

V Danksagung

V DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Gregor Grass und Dr. Matthias Hanczaruk. Dr. Gregor Grass danke ich für das Dissertationsthema, die vielen Ideen für die Ausführung der Arbeit und das häufige Korrekturlesen. Für die permanente Hilfe in der Durchführung der PCRs, auch wenn wiederholt nichts funktionierte, seine aufbauenden Worte und sein fröhliches Wesen danke ich Dr. Matthias Hanczaruk.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Straubinger bedanke ich mich für den wissenschaftlichen Rat und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Herrmann Meyer für die langen Gespräche über das Dissertationsthema, seine Anregungen für die praktische Durchführung und den schriftlichen Teil sowie für das Korrekturlesen.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der tiermedizinischen Fakultät der LMU, allen voran Dr. Richard Dietrich, danke ich für das Bereitstellen der vielen *B. cereus* Proben.

Bei den Mitarbeitern der TE 40 bedanke ich mich für die immerwährende Hilfe im Labor. Hierbei danke ich besonders Paula Bleichert und Daniela Horenkamp, die mich anfangs an der Hand genommen und mir alles gezeigt haben. Für die Unterstützung in Labortätigkeiten danke ich Kristoffer Timm.

Ich danke Silvia Reis für die Ablenkung in schlechten Zeiten und die schönen Stunden im gemeinsamen Büro.

Meiner ganzen Großfamilie und besonders meiner Mutter Silvia Hübner danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben, auch wenn ich selbst an mir zweifelte. Bei Marco Stephan bedanke ich mich zusätzlich für das Zuhören und seine immerwährende Geduld.

Ich danke dem Passierschein A 38, der mich insbesondere im letzten Jahr am Institut begleitet hat.