
Inhalt

18. Jahrgang
Heft 1/2/2002

R. Waneck
Grußwort

F. Allerberger, M.P. Dierich
Vorwort

D. Khaschabi, M. Schönbauer
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Innsbruck
(Direktor: Hofrat Dr. M. Schönbauer)

Mikrobiologische Diagnostik von Milzbrand

J. Heesemann, A. Rakin
Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie,
Lehrstuhl Bakteriologie, München
(Vorstand: Prof. DDr. J. Heesemann)

Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Pest

D. Tsereteli 1, L. Bakanidze 1, I. Velijanashvili 1, L. Beridze 1, M. Manrikyan 2, M. Shakhikyan 2, M. Kekelidze 1, E. Zangaladze 1, N. Tsertsvadze 1, P. Imnadze 1
1 National Center for Disease Control, Tbilisi, Georgia
(Director: P. Imnadze, Ph.D., M.D.)
2 Center for Prevention of Particularly Dangerous Infections, Yerevan, Armenia
(Director: Dr. M. Manrikyan)

Plague in Southern Caucasus

P. Imnadze 1, L. Bakanidze 1, M. Manrikyan 2, T. Kukhalashvili 1, E. Zangaladze 1, M. Kekelidze 1, D. Tsereteli 1, M. Nadiradze 1, Sh. Tsanova 1, N. Tsertsvadze 1
1 National Center for Disease Control, Tbilisi, Georgia
(Director: P. Imnadze, Ph.D., M.D.)
2 Center for Prevention of Particularly Dangerous Infections, Yerevan, Armenia
(Director: Dr. M. Manrikyan)

Anthrax in Southern Caucasus

E. Hofer
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling
(Direktor: A. Univ.-Prof. Dr. W. Schuller)

Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Tularämie

D. Wilfingseder, H. Stoiber
Institut für Hygiene und Sozialmedizin und
Ludwig Boltzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck
(Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. M.P. Dierich)

Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren

K. Grif 1, F. Allerberger 1, M.P. Dierich 1, A. Wimmer 2, H. Plicka 2
1 Institut für Hygiene und Sozialmedizin, Innsbruck
(Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. M.P. Dierich)
2 Amt für Wehrtechnik, Wien
(Leiter: Bgdr. R.F. Hofer)

***Bacillus anthracis*: Speciesbestimmung und Subtypisierung
mittels automatischer Ribotypisierung**

[zurück zur Übersicht](#)

Grußwort



Im Herbst 2002 wurde die Möglichkeit einer bioterroristischen Bedrohung zur traurigen Gewissheit. Österreich befand sich dabei in der glücklichen Lage, auf bestehende Krisenpläne zurückgreifen zu können. Dem guten Zusammenspiel der involvierten Einsatzkräfte, der Gesundheitsbehörden und der Labors ist es zu verdanken, dass "Anthraxalarm" bald zum Routinefall wurde. Die Ausarbeitung von Strategien zur Bewältigung möglicher Szenarien im Zusammenhang mit der Verwendung von biologischen oder chemischen Kampfstoffen bleibt weiterhin eine wichtige Aufgabe der Gesundheitsbehörden. Wesentliche Bausteine dabei sind effiziente epidemiologische Überwachung und kompetente Diagnoseeinrichtungen. Veranstaltungen wie der "2. Innsbrucker Milzbrand-Pest-Tularämie-Workshop" leisten dazu einen unverzichtbaren Beitrag. In diesem Sinne sei den TeilnehmerInnen für Ihre Bereitschaft, an dieser wichtigen Aufgabe des öffentlichen Gesundheitswesens mitzuwirken, herzlich gedankt.

*Univ.-Prof. Dr. Reinhart Waneck
Gesundheitsstaatssekretär*

[zurück zum Inhalt](#)

Vorwort

*Milzbrand, Pest und Tularämie sind gefürchtete Infektionskrankheiten. Vor allem die Eignung der entsprechenden Erreger als Mittel für die biologische Kriegsführung hat zur Stigmatisierung von *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* und *Francisella tularensis* geführt. Der klinische Mikrobiologe muss dennoch mit der Diagnostik dieser Krankheiten vertraut sein. Milzbrand und Tularämie sind auch im Jahr 2002 in Österreich noch endemische Zoonosen; der Import von Pest ist im Zeitalter des Ferntourismus ein realistisches Szenario. Am 4. Oktober 2001 wurde in Florida bei einem 63-jährigen Lungenmilzbrand festgestellt. Mit diesen Fällen wurde leider bisher bewiesen, dass auch Bioterrorismus als mögliches Szenario grundsätzlich zu bedenken ist. Zur Sicherstellung der humanmedizinisch-diagnostischen Basisversorgung wurde im März 1998 vom damaligen Bundesministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales, als Konsequenz der Pestausbrüche in Indien im Jahr 1994, erstmalig die Abhaltung eines Fortbildungsmoduls "Milzbrand - Pest - Tularämie" mit Vorträgen und praktischen Laborübungen in Innsbruck unterstützt. Aufgrund der großen Nachfrage wurde nun dieser Innsbrucker Milzbrand-, Pest- und Tularämie-Workshop auf Ersuchen des Bundesministeriums für soziale Sicherheit und Generationen am 25. - 26. März 2002 zum zweiten Mal durchgeführt. Dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur danken wir für den Auftrag zur Einladung von Teilnehmern aus Georgien. Besonderer Dank auch der Redaktion des ANTIBIOTIKA MONITOR, die uns ermöglicht, die Zusammenfassungen der Vorträge dieses Fortbildungsmoduls im vorliegenden Heft zu publizieren.*

*Univ.-Prof. Dr. Franz Allerberger
Bundesstaatliche bakteriologische-
serologische
Untersuchungsanstalt Innsbruck*

*o.Univ.-Prof. Dr. Manfred P. Dierich
Vorstand des Instituts für Hygiene und
Sozialmedizin der Universität Innsbruck*

zurück zum Inhalt

Mikrobiologische Diagnostik von Milzbrand

D. Khaschabi, M. Schönbauer

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Innsbruck

(Direktor: Hofrat Dr. M. Schönbauer)

- **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Key-words**
 - **Summary**
 - **Einleitung**
 - **Die Probennahme**
 - **Der Erreger**
 - **Gramfärbung**
 - **Sporenfärbung**
 - **Wachstum in Bouillon**
 - **Koloniemorphologie auf Normalagar und Blutagar**
 - **Medusenhaupt**
 - **Sonstige Eigenschaften der Kolonie von *B. anthracis***
 - **Abgrenzung von ähnlichen Arten**
 - **Beweglichkeit**
 - **Phagentest**
 - **Kapselbildung**
 - **Perlschnurtest**
 - **Serologischer Nachweis von *B. anthracis*-Antigenen**
 - **Tierversuch zu diagnostischen Zwecken**
 - **Vorsichtsmaßnahmen**
 - **Literatur**
-

Schlüsselwörter:

Anthrax, Milzbrand, Diagnose, Ascoli

Zusammenfassung

Die mikrobiologische Diagnostik von Milzbrand (Anthrax) stützt sich auf serologische Verfahren wie Agargelpräzipitation (Ouchterlony) und Thermopräzipitation (Ascoli) und den kulturellen Nachweis auf Blut- und Nähragar. Die besonderen Eigenschaften der Kultur mit den charakteristischen Ausläufern, der vollkommen fehlenden Hämolyse, dem Medusenhaupt, Nasenbildung und Eischnee-Effekt werden zusammenfassend beschrieben und die Charakteristiken des Erregers im Perlschnurtest, Kapselfärbung nach Olt und mit Tusche, die Sporenfärbung nach Rakette sowie die Beweglichkeitstests und der Phagentest dargestellt.

Bei Beachtung all dieser Kriterien ist eine schnelle und sichere Diagnose leicht möglich.

Key-words:

Anthrax, diagnosis, Ascoli

Summary

The microbiological diagnostic of anthrax includes serological detection of anthrax

antigens by means of Ouchterlony agar precipitation test, thermoprecipitation test of Ascoli and the growth of *Bacillus anthracis* on ordinary solid media and blood agar. Special features of colonies such as the appearance of a medusa head, lack of haemolysis and cultural differentiation are described. Diagnostic characteristics such as the pearl-string test, capsule stain after Olt and indian ink preparation, spore stain after Raketten, motility- and phage tests are mentioned and demonstrated.

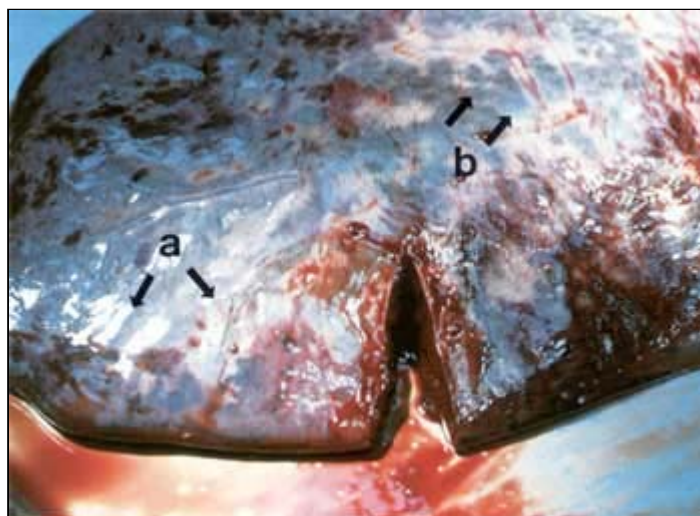
Taking into consideration the above microbiological techniques a quick and safe diagnosis of anthrax is easily achievable.

Einleitung

Der Milzbrand, Anthrax (Abb. 1), ist eine Zoonose, die durch den Erreger *Bacillus anthracis* hervorgerufen wird. Es ist eine primär bei Tieren, vor allem Haus- und Nutztieren vorkommende, akute Infektionskrankheit, die – meistens vom Tier – auf den Menschen übertragen werden kann. Zusammengefasste Literatur findet sich bei Blobel und Schließer [1].

Die vorliegende Arbeit stellt eine Zusammenfassung der mikrobiologischen Nachweisverfahren und Differenzierungsmethoden dar.

Abbildung 1: Milz (Rind) erheblich geschwollen, die Anschnittfläche quillt hervor und ist fast schwarz, die Organränder sind stumpf, das ausfließende Blut dunkelrot bis schwarz und insbesondere sind zahlreiche konfluierende Kapselblutungen (Pfeil a) und Thrombosen (Pfeil b) der kapsulären Blut- und Lymphgefäße zu sehen; es handelt sich um den klassischen Prototyp des hämorrhagischen Milztumors.



Die Probennahme

Bei der Probenziehung ist grundsätzlich zu unterscheiden, ob es sich um Material- oder Umweltproben oder um klinische Proben handelt. Die Aufarbeitung aus Material- und Umweltproben gestaltet sich schwierig und erfordert einige Übung und Erfahrung. Im Unterschied dazu ist aus klinischem Material die Anzucht in der Regel ohne Schwierigkeiten möglich, sowohl aus Karbunkeln, Blutproben oder Organabstrichen. In Verbindung mit den Krankheitszeichen und dem pathologischen Befund reicht in der Regel der mikroskopische Nachweis bekapselter Zellen (Bambusform) in den Organen

aus, um die Diagnose zu erhärten. Die in der Tiermedizin übliche Vorgangsweise der Einsendung eines abgebundenen und an der Schnittfläche abgebrannten Ohres des Tierkadavers sollte in dieser Form nicht mehr ausgeführt werden, vielmehr ist bei an Milzbrand gefallenen Tieren Blut durch Punktion eines großen Gefäßes mittels einer Einmalspritze zu gewinnen, welche mit einem Kanülenschutz fest verschlossen, abgeklebt und gut verpackt, mit einem entsprechenden Warnhinweis versehen, in das Labor gebracht wird. Die Anzucht erfolgt auf Blutagar sowie auf Nähragar.

Der Erreger

B. anthracis ist ein aerober und fakultativ anaerober Sporenbildner. Er ist ein unbewegliches, zylindrisches, grampositives Stäbchen von 3 - 5 µm Länge und 1 µm Breite. Mit den als „Pseudomilzbrandbazillen“ bezeichneten Arten *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. megaterium* ist er morphologisch leicht zu verwechseln. In vivo sind die Stäbchen eher kurz, leicht abgerundet, einzeln oder in kurzen Ketten angeordnet. In der Kultur werden lange Fäden aus unbekapselten Bazillen gebildet.

Milzbrandbazillen wachsen auf allen gebräuchlichen festen Nährböden und bilden nach 24 Stunden aerober Bebrütung bei 37° C oberflächliche, mittelgroße, matte Kolonien von grauweißlichem Aussehen. Auf der Agaroberfläche bilden virulente Stämme die charakteristischen Ausläufer (Medusenhaupt), die in kleinerem oder größerem Bogen zur Kolonie zurückkehren oder sich nur wenig vom Rande der Kolonie entfernen. Die Ausläufer bestehen aus kettenförmig aneinander gelagerten Stäbchen.

Die Milzbrandsporen haben eine ellipsoide Form, sind 0,7 - 0,8 µm dick und ca. 1,5 µm lang. Sie liegen zentral ohne Auftreibung in der Zelle. Die Sporulation erfolgt nur außerhalb des Körpers bei Anwesenheit von Sauerstoff und einer Temperatur von über 12° C und in der Kultur am Schluss der logarithmischen Phase nach 24 bis 48 Stunden, besonders bei üppigem Wachstum.

Die Virulenz des Erregers ist abhängig von der Kapselbildung und dem Anthrax-Toxin. *In vivo* wird eine Kapsel gebildet, die mit Spezialfärbungen darstellbar ist. *In vitro* wird die Kapsel nur unter bestimmten Voraussetzungen (CO₂-Spannung, Na-Bicarbonat-Zusatz) gebildet.

Gramfärbung

Direkter Nachweis von *B. anthracis* in Blut- und Organabstrichen oder Kulturausstrichen: Plumpe, grampositive Stäbchen mit ausgesprochener Neigung zur Fadenbildung (Bambusform). Grampositives Verhalten (Abb. 2) kann mit dem Alter verloren gehen, und dort, wo Gramlabilität vorkommt, waren die Zellen in den früheren Wachstumsstufen grampositiv. Die Gram-Färbung sollte daher so bald wie möglich durchgeführt werden, d.h. gewöhnlich innerhalb von 24 Stunden nach Ausstreichen und Inkubation auf Blutagar.

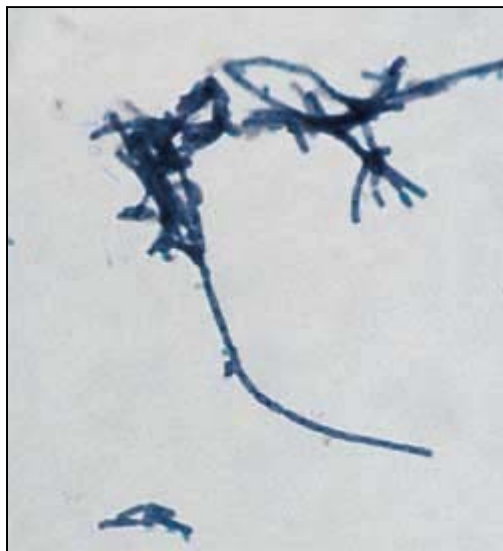
Abbildung 2: Gram-Färbung der Kultur; der Erreger ist etwas gramlabil und zeigt Bambusform (Ölimmersion ca. 1.000 x)



Sporenfärbung

Für Routinezwecke sind Kulturen auf Blutagarplatten, die 2 - 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, ausreichend, um Sporulation und Sporenmorphologie beobachten zu können. Zum Nachweis der Sporen eignet sich die Sporenfärbung nach Rakette (Abb. 3).

Abbildung 3: Intra- und extrazelluläre Sporenbildung; Färbung nach Rakette (Ölimmersion ca. 1.000 x)



Durchführung der Sporenfärbung nach Rakette [2]:

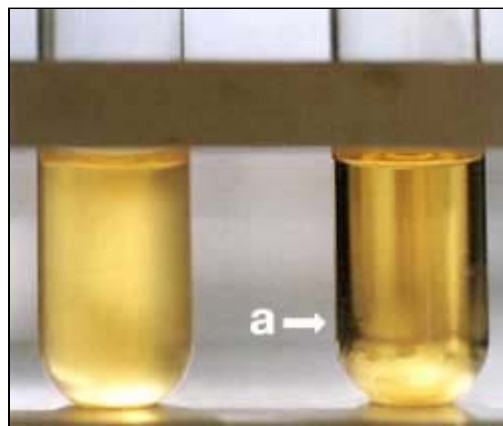
1. Präparat lufttrocknen.
2. Fixieren, indem das Präparat sechsmal durch die Flamme gezogen wird.
3. Objektträger mit 5%iger, wässriger Malachitgrünlösung bedecken.
4. 20 Sekunden aufkochen und weitere 30 Sekunden stehen lassen.
5. Kräftig abspülen.
6. 1 Minute mit 2,5%iger, wässriger Eosinlösung nachfärben.
7. Abspülen und abtrocknen.

Die Bakterienzellen färben sich rot, die Sporen grün. Die Form und die Position der Sporen werden beurteilt.

Wachstum in Bouillon

In flüssigen Nährmedien wächst *B. anthracis* als flockiger, watteartiger Bodensatz ohne Häutchenbildung, während die überstehende Flüssigkeit gewöhnlich klar bleibt (Abb. 4). Wenn keine Verunreinigung zu befürchten ist, gibt zudem das charakteristisch flockige Wachstum in Bouillon ohne Trübung der überstehenden Nährlösung wertvolle diagnostische Hinweise [3].

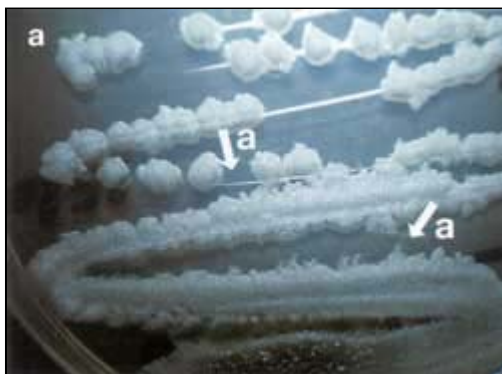
Abbildung 4: Die Bouillon ist klar, ohne Häutchen und hat ein wolkiges, wattiges Sediment (Pfeil a)



Koloniemorphologie auf Normalagar und Blutagar

Die Anzucht erfolgt auf Blutagar, die typischen Kolonien sind leicht zu erkennen. Die Milzbrandzellen bilden nach Bebrüten über Nacht große (2 - 5 mm) weiße Kolonien mit rauer Oberfläche. Auf Blutagar wird keine Hämolyse gebildet, allenfalls erfolgt eine leichte Aufhellung unter der Kolonie. Ausläufer am Kolonierand sind häufig zu finden (Medusenhaupt), aber nicht immer (Abb. 5a und b).

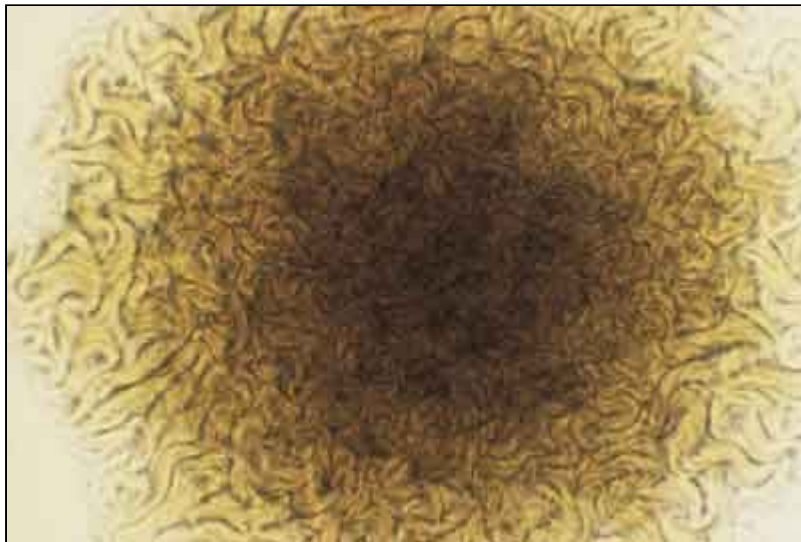
Abbildung 5a und b: Die Kultur auf Nähragar (a) mit typischen Ausläufern (Pfeil a) und auf Blutagar (b); vollkommen fehlende Hämolyse!



Medusenhaupt

Man legt ein Deckglas auf junge Kolonien auf einer Agaroberfläche (Standard-Nähragar) und untersucht die Ränder der Kolonien mit einem 10er Objektiv. Die Kolonien sind an ihren Rändern von ausstrahlenden, bogenförmig gewundenen, lockigen oder zopfartigen Ausläufern umgeben. Für Kolonien der gesamten *B. cereus*-Gruppe ist dies ein häufiges Merkmal, das sowohl bei Kolonien vieler *B. cereus*-, *B. thuringiensis*- und *B. cereus var. mycoides*-Stämme als auch bei *B. anthracis*-Stämmen auftreten kann (Abb. 6).

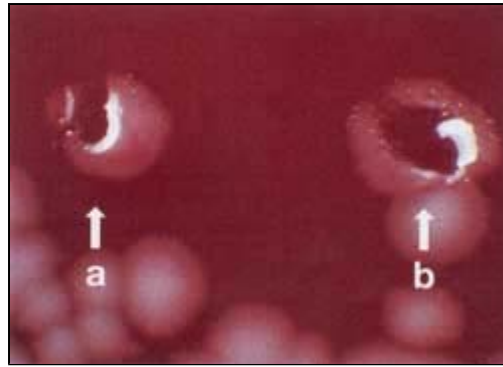
Abbildung 6: Medusenhaupt; sowohl am Kolonierand als auch im Zentrum bilden die fadenförmig wachsenden Bazillen Bakterienketten, die stets gewunden sind und immer in die Kolonie zurückkehren. (Lupe ca. 60 x)



Sonstige Eigenschaften der Kolonie von *B. anthracis*

Eine weitere, diagnostisch bedeutsame Erscheinung lässt sich im Zusammenhang mit dem Abimpfen von Koloniematerial mittels der Öse feststellen (Abb. 7). Wird mit der Öse oder Impfnadel unter einen der Ausläufer einer Milzbrandkolonie gefahren und dieser von der Nährbodenoberfläche abgehoben, bleibt er steif wie geschlagenes Eiweiß stehen – Eischnee-Effekt [4]. Ebenso kann bei Abimpfen von Koloniematerial festgestellt werden, dass sowohl der auf dem Nährboden verbleibende Teil der Kolonie als auch das an der Öse haftende Koloniematerial eine steife, spitz auslaufende „Nase“ zieht, die nicht abknickt oder in sich zusammenfällt [5]. Das Koloniematerial von *B. cereus* ist wesentlich weicher und zeigt diese Erscheinung nicht, die Kolonien von *B. cereus var. mycoides* haften so fest auf dem Nährboden, dass sich von ihnen nicht genügend Material zur Durchführung dieser Prüfung entfernen lässt.

Abbildung 7: „Eischnee-Effekt“ nach Zusammenschieben (a) und „Nasenbildung“ nach Anheben der Kolonie mit einer Platinöse (b)



Abgrenzung von ähnlichen Arten

Alle Versuche zur biochemischen Abgrenzung des Milzbranderreger von anderen aeroben Sporenbildnern sind bisher wenig erfolgreich gewesen. Auch das API-50 CHB-System von BioMerieux ist zur Differenzierung zwischen *B. anthracis* und seinen Verwandten aus der *Cereus*-Gruppe nur beschränkt geeignet.

Andere ähnliche Bazillenarten zeigen nicht den Eischnnee-Effekt und sind beweglich. Kolonien von *Streptomyces endus* sind ähnlich wie die von *B. anthracis*, haften aber ganz fest auf dem Agar. Kolonien von *B. cereus* sind auf Blutagar gelblich gefärbt und von einem deutlichen Hämolysehof umgeben. Kolonien von *B. cereus var. mycoides* sind ebenfalls von einem Hämolysehof umgeben, bei schwach ausgeprägter Hämolyse ist die gefiederte Kolonie, die ganz fest auf dem Nährboden haftet, ein weiteres typisches Unterscheidungsmerkmal.

Beweglichkeit

B. anthracis ist unbeweglich. Obwohl verschiedene Nachweismethoden für die Motilität zur Verfügung stehen, sind die beiden zuverlässigsten das Wachstum in halbfestem Agar und die Methode des hängenden Tropfens. Für den hängenden Tropfen sollten junge (4 - 7 Stunden), bei 30° C bebrütete Nährbouillonkulturen im konventionellen, hängenden Tropfen mit einem starken Objektiv oder, sofern vorhanden, im Phasenkontrast untersucht werden.

Phagentest

Beim Phagentest (Abb. 8) lassen sich sehr gute Resultate mit der Anwendung des γ -Phagen erzielen [6]. Der Test lässt sich von einer 3- bis 4-stündig bebrüteten Vorkultur in Nährbouillon genauso gut durchführen wie von einer leicht trüben Suspension des verdächtigen Koloniematerials in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder auch mit dem unsuspendierten Koloniematerial direkt. Stets sollte jedoch als positive Kontrolle ein bekannter Milzbrandstamm und als negative Kontrolle ein Stamm von *B. cereus* bei gleicher Präparationstechnik in die Untersuchung mit einbezogen werden. Auf der Rückseite einer Petrischale mit Blutagar werden mit der Schablone kreisrunde Flächen mit einem Durchmesser von 2,0 cm markiert. Auf je eine der Kreisflächen wird mit der Öse das Probenmaterial möglichst gleichmäßig verteilt. Dann wird der Inhalt einer Platinöse (im Durchmesser 3 mm) mit Phagensuspension exzentrisch auf diesen Bereich auslaufen

gelassen, wobei bei der Verwendung flüssiger Bakterienzellpräparationen diese erst auf dem Nährboden angetrocknet sein müssen, bevor der Phage aufgebracht wird. Der Ansatz wird 7 - 8 Stunden bei 37° C bebrütet und dann abgelesen. Bei positivem Phagentest ist an der Stelle, wo die Phagensuspension aufgetropft wurde, ein vom Bakterienzellrasen freier Bereich zu sehen. In speziellen Fällen, in denen keine Verunreinigung des Materials zu erwarten ist, z.B. bei post mortem durch Venenpunktion gewonnenem Blut oder unter sterilen Kautelen präparierten Milzstückchen der für den Tierversuch verwendeten Mäuse, kann der Phagentest direkt mit dem Probenmaterial durchgeführt werden, indem das Material analog der oben beschriebenen Methodik auf der Agaroberfläche ausgestrichen wird [7].

Abbildung 8: Phagentest; runde, wachstumfreie Zonen auf Blutagar



Kapselbildung

B. anthracis-Keime besitzen so lange keine Kapseln, bis sie unter Bedingungen, die die Kapselbildung fördern, wachsen. Die Untersuchung auf Kapseln in den Blut- oder Organabstrichen von milzbrandverdächtigen Tieren und Labortieren, die für Pathogenitätstests und zur Reisolierung inokuliert wurden, wird nach Olt durchgeführt [2]:

1. Hitzefixiertes Präparat färben mit 3% wässriger Safraninlösung.
2. Erhitzen bis zum Aufkochen.
3. Abspülen mit Wasser, abtrocknen (Untersuchung unter Wassereinschluss).

Nachweis der Kapselbildung auf Trypticase Soy Agar (TSA) mit 0,9% Natriumbicarbonat. (Ist kein solcher Agar vorrätig, kann auch normaler Nähragar benutzt werden, auf den eine entsprechende Menge steril filtrierter 9%iger Natriumbicarbonatlösung ausgespatelt wurde – Endkonzentration 0,9%.) Auf die Agaroberfläche wird Material der verdächtigen Kolonie ausgestrichen. Die Platte wird in ca. 5%iger CO₂-Atmosphäre bebrütet (2 Tage, 37° C). Dann wird die Kultur mit 10%iger Formaldehydlösung überschichtet, nach einer

Einwirkungszeit von 1 h abgeschwemmt und in ein Reagenzglas überführt. Eine kleine Öse (ca. 1 µl) wird von dieser Suspension auf einen Objektträger übertragen und mit ebenso wenig Zeichentusche vermischt, dann wird ein Deckglas aufgelegt und so angedrückt, dass eine dünne, durchscheinende Schicht entsteht. Mit dem Mikroskop können dann die dicken Kapseln als partikelfreie Räume um die Milzbrandfläche dargestellt werden (Abb. 9, 10).

Abbildung 9: Kapselfärbung nach Olt, Ölimmersion ca. 1.000 x



Abbildung 10: Kapseldarstellung (Pfeil) mit Tusche, Ölimmersion ca. 1.000 x



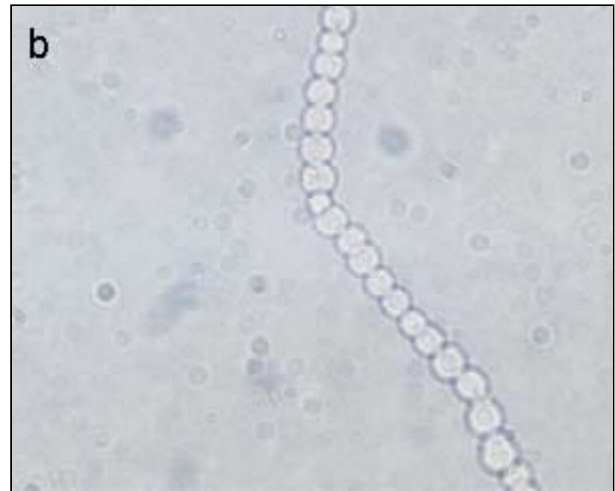
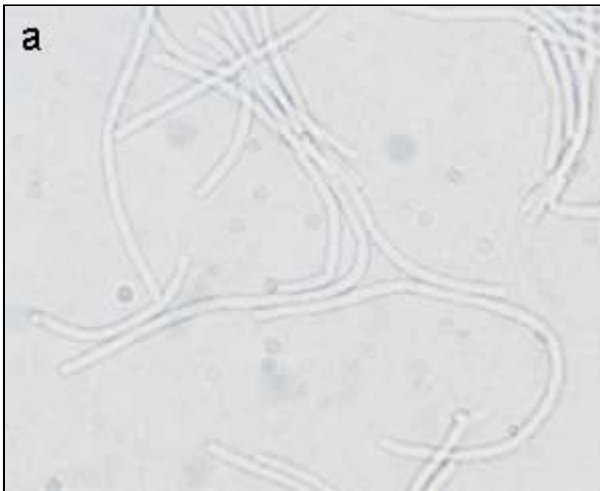
Perlschnurtest

Der Perlschnurtest (Abb. 11a und b) kann zur schnellen Erkennung von Milzbrandbazillen beitragen. Dieser Test besitzt für die Diagnose des Milzbrandes eine relativ große Aussagekraft, allerdings muss auch mit dem Auftreten penicillinresistenter Stämme gerechnet werden, wodurch die Beweiskraft etwas eingeschränkt wird.

Die Methode beruht darauf, dass es unter Penicillineinwirkung zur Bildung kugelig deformierter Milzbrandzellen kommt, die sich entweder knäuelig zusammenlagern oder so angeordnet sind, dass sie einer Perlschnur gleichen.

Hierzu wird die Oberfläche je einer Müller-Hinton-Agarplatte oder Standard-Nähragar mit 0,1 ml einer Vorkultur der zu untersuchenden Isolate und des bekannten Kontrollstammes gleichmäßig beimpft. In der Mitte der Platte wird ein Plättchen aufgelegt, das 10 IE Penicillin enthält. Der Ansatz wird 3 - 6 Stunden bei 37° C bebrütet, und dann wird ein Agarstück zur Untersuchung im Grenzbereich der Hemmzone herausgeschnitten, auf einen Objektträger gelegt, mit einem Deckglas versehen und unter dem Mikroskop mit dem Ölimmersionsobjektiv (60- bis 100fache Vergrößerung) betrachtet. Befinden sich im Grenzbereich der Hemmzone die typischen kugeligen Zellformen, ist der Test positiv [8, 4].

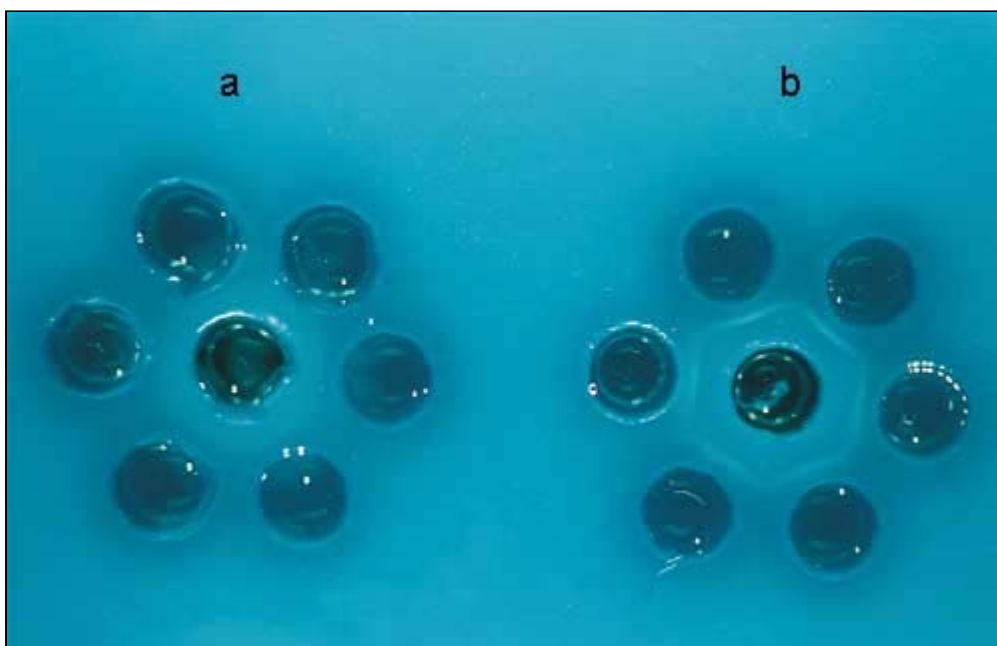
Abbildung 11a und b: Fadenförmiges Wachstum auf Müller-Hinton-Agar (a), das unter Penicillinzusatz zu „Perlschnüren“ degeneriert (b).



Serologischer Nachweis von *B. anthracis*-Antigenen

Die Thermopräzipitation nach Ascoli [9] wird immer dann angewandt, wenn ein kultureller Nachweis des Erregers nicht möglich ist. Wenn Milzbrandbazillen in den Organen z.B. aufgrund fortgeschrittener Fäulnis mikroskopisch nicht mehr erfassbar sind, kann die Ascoli-Präzipitation durchgeführt werden. Sie kann auch zur Bestimmung von Milzbrandstämmen benutzt werden. Die Methode beruht auf dem Nachweis gelöster spezifischer Milzbrandantigene durch die Präzipitation. Zur Durchführung der Reaktion werden 2 bis 3 g zerkleinertes Organmaterial kurz aufgeköcht und durch Papierfilter klar filtriert. In kleinen Präzipitationsröhrchen wird zuerst das präzipitierende Milzbrandserum mit einer Kapillare auf den Röhrchenboden gebracht und dann der klare Extrakt auf das Serum geschichtet. Im positiven Falle bildet sich innerhalb weniger Minuten an der Berührungsfläche ein Präzipitationsring. Die Reaktion kann auch als Agargelpräzipitation nach Ouchterlony (Abb. 12) durchgeführt werden [10]. Die Thermopräzipitation ist keine eindeutig beweisende diagnostische Methode, weil auch positive Reaktionen durch Antigene aus *B. cereus* und *B. laterosporus* vorgetäuscht werden können.

Abbildung 12: Agargelpräzipitation: negative Kontrolle a und positive Reaktion b



Tierversuch zu diagnostischen Zwecken

Im Zweifelsfall kann auch ein Tierversuch zum Nachweis der Pathogenität durchgeführt werden. Zur Absicherung der Diagnose reicht nach unserer Auffassung die Durchführung von einem Teil der oben beschriebenen Untersuchungen völlig aus. Bei einem Neuausbruch erscheint es jedenfalls sinnvoll, auch eine Charakterisierung des Isolates vorzunehmen, die aber stets Speziallabors vorbehalten ist.

Vorsichtsmaßnahmen

Unter normalen Laborbedingungen ist das Infektionsrisiko für das Personal jedenfalls nicht größer als bei der Arbeit mit anderen pathogenen Erregern auch. Bei Unfällen ist die sofortige Therapie mit Penicillin oder anderen Antibiotika angezeigt.

Sämtliche Verbrauchsmaterialien und Abfälle sind jedenfalls thermisch zu beseitigen, da die Sporen des *B. anthracis* eine ungewöhnlich hohe Tenazität und eine ganz erhebliche Thermoresistenz aufweisen und im normalen Erdboden gut 100 Jahre und mehr (!) infektionstüchtig überleben. Da *B. anthracis* auch als biologische Waffe zu berüchtigter Berühmtheit gekommen ist, muss bei der Asservierung von Stämmen und Isolaten die höchstmögliche Sicherheit gefordert werden, weil sich dieser Erreger durchaus auch für kriminellen Missbrauch eignet. Derartige Isolate sind daher unter Verschluss zu halten, zu codieren und damit für nicht ausgewiesene Experten unkenntlich zu machen. Auch empfiehlt es sich, für alle nur denkbaren Fälle einen Alarmplan zu entwickeln und die Mitarbeiter entsprechend zu schulen.

Literatur:

1. Böhm R.: „Milzbrand.“ Aus: Blobel H. und Schließer T.: „Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.“ Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Bd. IV (1982) 259-331.
2. Winkle St.: „Mikrobiologische und serologische Diagnostik.“ Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1979) 88.
3. Seidel G.: „Die aeroben Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung des Milzbrandbazillus.“ In: Habs H. und Kathe J.: „Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie.“ Heft 17. Johann Ambrosius Barth, Leipzig (1963).
4. Feeley J.C. and Patton C.M.: „Bacillus.“ In: Lennette E.H., Balows A., Hausler J.R.W.J. and Truant J.P.: „Manual of Clinical Microbiology.“ American Society for Microbiology, Washington D.C. 3ed. (1980) 145-149.
5. Hailer E., Heicken K.: „Untersuchungen zur Bekämpfung des gewerblichen Milzbrandes.“ VIII. Mitt. Z. Hyg. 137 (1953) 611-639.
6. Brown E.R., Cherry W.B.: „Specific identification of Bacillus anthracis by means of a variant bacteriophage.“ J. Infect. Dis. 96 (1955) 34-39.
7. Kielwein G.: „Ein Vorschlag zur praktischen Differenzierung des Bacillus anthracis durch den Phagentest.“ Tierärztl. Umsch. 12 (1957) 183-186.
8. Bailie W.E., Stowe E.C.: „Simplified test for identification of Bacillus anthracis.“ In: „Proceedings Abstracts

of annual meeting.“ Am. Soc. Microbiol. (1977) 48.

9. Ascoli A.: „Die Präzipitation bei Milzbrand.“ Zbl. Bakt. I. Orig. 58 (1957) 63-70.

10. Mathois H.: „Zur Anwendung der Agardoppeldiffusion in der Milzbranddiagnostik.“ Mh. Tierhk. 14 (1962) 407-412.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Daryusch Khaschabi

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen

A-6020 Innsbruck, Langer Weg 27

E-Mail: khaschabi@hotmail.com

[zurück zum Inhalt](#)

Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Pest

J. Heesemann, A. Rakin

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie,

Lehrstuhl Bakteriologie, München

(Vorstand: Prof. DDr. J. Heesemann)

- **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Key-words**
 - **Summary**
 - **Einleitung**
 - **Mikrobiologie des Pesterregers**
 - **Molekularbiologie der Pathogenität von *Y. pestis***
 - **Ökologie und Epidemiologie**
 - **Klinik**
 - **Diagnostik**
 - **Therapie und Prophylaxe**
 - **Gewinnung des Bubonen-Aspirats und Färbung nach Wayson**
 - **Literatur**
-

Schlüsselwörter:

Rattenfloh, Beulenpest, Pestherde, Wayson-Färbung, Virulenzplasmid, Multiresistenz

Zusammenfassung

Die Pest gehört nicht zu den „ausgestorbenen“ Seuchen. In den Ländern Tansania, Zaire, Vietnam, Peru, Birma (Myanmar) und Madagaskar erreicht sie beachtenswerte Infektionshäufigkeiten. Nach dem 11. September 2001 wurde der Pesterreger als potentielle bioterroristische Waffe erneut in der Öffentlichkeit diskutiert. Das Jahr 2001 hat durch die Veröffentlichung der Genomsequenz von *Yersinia pestis* auch einen großen Erkenntnisgewinn für die Pestforschung erbracht.

Es gibt drei typische Krankheitsbilder der Pest: Beulenpest, Pestsepsis und Pestpneumonie. Die schnelle Diagnose und eine adäquate Antibiotikatherapie sind lebensrettend. Das therapeutische Mittel der ersten Wahl ist Streptomycin. Prophylaktisch können Tetracycline oder Trimethoprim-Sulfamethoxazol gegeben werden. Eine Antibiotikatestung ist dringend erforderlich, seitdem in Madagaskar multiresistente Pesterreger isoliert wurden.

Key-words:

Rat flea, bubonic plague, plague foci, Wayson-stain, virulence plasmid, multidrug resistance

Summary

Plague has not disappeared. It still belongs to a dangerous infectious disease in Tanzania, Zaire, Vietnam, Peru, Birma (Myanmar) and Madagascar. After September 11th, 2001 the causative agent of plague was again discussed as a potential bioterroristic weapon. In 2001 the total genome sequence of *Yersinia pestis* has been published and thus will stimulate *Y. pestis* research.

The principle forms of plague are bubonic, septicemic and pneumonic. A rapid diagnosis

and initiation of suitable antibiotic treatment are required to reduce lethality of this disease. Streptomycin is the drug of the first choice. Tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole are recommended for prophylaxis. *In vitro* testing of antibiotic resistance of *Y. pestis* is required since multidrug resistant strains have been reported in 1997.

Einleitung

Die Pest gehört zu den gefürchtetsten Infektionskrankheiten, die wir kennen [1]. Die Geschichte belegt wenigstens drei Pandemien, denen mehr als 100 Millionen Menschen zum Opfer fielen (Justinianische Pest: 6. Jahrhundert n. Chr., „Schwarzer Tod“: Mitte des 14. Jahrhunderts, Hongkong-Pest: Ende des 19. Jahrhunderts). Der Erreger, *Yersinia pestis*, wurde von Alexandre Yersin 1894 in Hongkong entdeckt. Einige Jahre später zeigten Ogata und Simond, dass der Pesterreger durch Rattenflöhe übertragen wird. Die Hongkong-Pest führte zu einer weltweiten Verbreitung des Pesterregers – erstmalig gelangte der Pesterreger an die Westküste Amerikas und nach Australien. Die Pest hat heute ihren Schrecken verloren. In Westeuropa gibt es keine Pestherde. Eine rechtzeitig erkannte Pesterkrankung kann mit Antibiotika effektiv therapiert werden. Dieser Zustand sollte uns aber nicht glauben lassen, dass die Pest besiegt sei.

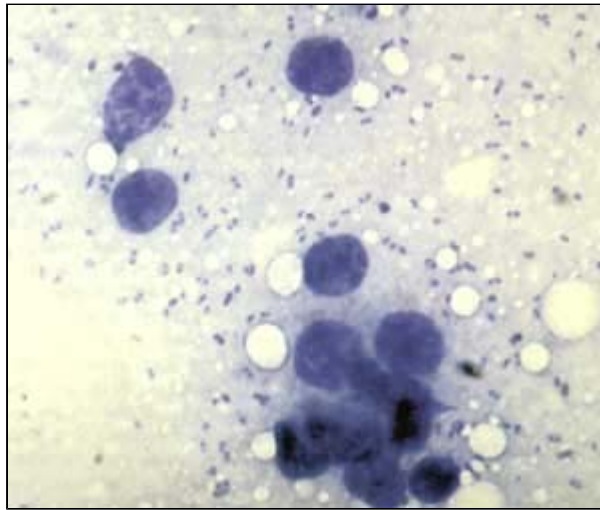
Auch heute noch gibt es auf allen Kontinenten Wildpestherde und entsprechend sporadische Pestfälle bis hin zu kleinen Pestepidemien [2]. Besonders Besorgnis erregend ist aber der kürzlich von einem Pestkranken auf Madagaskar isolierte *Y. pestis*-Stamm, der ein übertragbares Multiresistenzplasmid trägt [3]. Darüber hinaus haben die Milzbrandanschläge in den USA im letzten Quartal des Jahres 2001 gezeigt, dass bioterroristische Anschläge keine Fiktion sind. Der Pesterreger gehört auch in die Kategorie der Biowaffen. Dieser Beitrag soll altbekanntes Wissen zur Pest auffrischen, auf neue Erkenntnisse über den Pesterreger hinweisen und die Diagnose und Therapie der Pest verbessern.

Mikrobiologie des Pesterregers

Seit 1964 wird der Pesterreger als *Yersinia pestis* bezeichnet (früher *Pasteurella pestis*). Zum Genus *Yersinia* gehören inzwischen 11 Arten, wobei neben *Y. pestis* noch *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* von humanmedizinischer Bedeutung sind [1]. Die zwei letzteren Arten werden durch kontaminierte Lebensmittel aufgenommen und sind enteropathogen. Die Yersinien gehören wie Salmonellen und *Escherichia coli* zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Der Vergleich der 16S rDNA-Sequenzen zeigt, dass *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* eigentlich einer Art angehören sollten, wogegen *Y. enterocolitica* phylogenetisch deutlich abgegrenzt werden kann [4].

Alle drei Arten wachsen fakultativ anaerob mit Temperaturoptimum bei 28° C auf Blutagar und weniger gut auf Mac-Conkey-Agar. Das Wachstum erfolgt langsam (deutliche Kolonien nach 48 Stunden). *Y. pestis* zeigt eine Dissoziation in 2 Kolonietypen: 1. runde, glatte Kolonien mit scharfem Rand und 2. größere, granuliert, flache Kolonien mit fransenartigem Randsaum. Auf Blutagar wachsen Yersinien ohne Hämolyse. In Flüssigkeitsmedien bildet *Y. pestis* einen Bodensatz ohne deutliche Trübung des Mediums. *Y. pestis* kann nach Gram, Giemsa und Wayson (modifizierte Methylenblau-Färbung) angefärbt werden. Mikroskopisch stellen sie sich als pleomorphe, vorwiegend kokkoide Stäbchen dar. Nach Wayson- oder Methylenblau-Färbung wird die typische bipolare Anfärbung der ovalen Stäbchen (Sicherheitsnadelform) von *Y. pestis* deutlich (Abb. 1).

Abbildung 1: Ausstrich von Bubonen-Aspirat, bipolare Färbung der Stäbchen (Sicherheitsnadelform), Methylenblau-Färbung



Zur Absicherung der Identifizierung von *Y. pestis* kann das in Tabelle 1 dargestellte biochemische Differenzierungsschema dienen. Die signifikantesten Merkmale sind das Fehlen der Motilität und der Hydrolyse von Harnstoff [1]. Von epidemiologischem Interesse ist die Biotypisierung (eine Serotypisierung ist aufgrund des kurzkettigen O-Antigens nicht möglich). Man unterscheidet die Biotypen *antiqua*, *mediaevalis* und *orientalis* (Tab. 2). Zu ähnlichen Ergebnissen führen auch genomische Restriktionsmuster von *Y. pestis* [5].

Tabelle 1: Biochemische Differenzierung von *Y. pestis* zur Abgrenzung von enteropathogenen Yersinien

Reaktion	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i> (Biotypen I B, II - IV)
Beweglichkeit	-	+	+
Harnstoff	-	+	+
Aesculin	-/+	+	-
Saccharose	-	+	+
Melibiose	-	+	-

Tabelle 2: Biovarietäten von *Y. pestis*

Biovar	NO ₃ -Reduktion	Glycerin	Vorkommen
<i>Antiqua</i>	+	+	Zentralasien, Afrika Vorderer Orient,
<i>Mediaevalis</i>	-	+	Kasachstan
<i>Orientalis</i>	+	-	Amerika, Afrika, Asien

Y. pestis wird schnell abgetötet durch Erwärmen auf 56° C für 15 min und durch Sonnenlichtexposition (3-4 h). In getrockneten Sekreten oder Blut und im Flohfäzes ist der Erreger über 3 Wochen lebensfähig. In Erdhöhlen von Nagetieren und im Rattenfloh kann *Y. pestis* über ein Jahr überleben. Da frische *Y. pestis*-Isolate in der Regel hoch virulent sind, dürfen die Erreger oder Pest-verdächtige Proben nur in einem L3-Sicherheitslabor bearbeitet werden.

Molekularbiologie der Pathogenität von *Y. pestis*

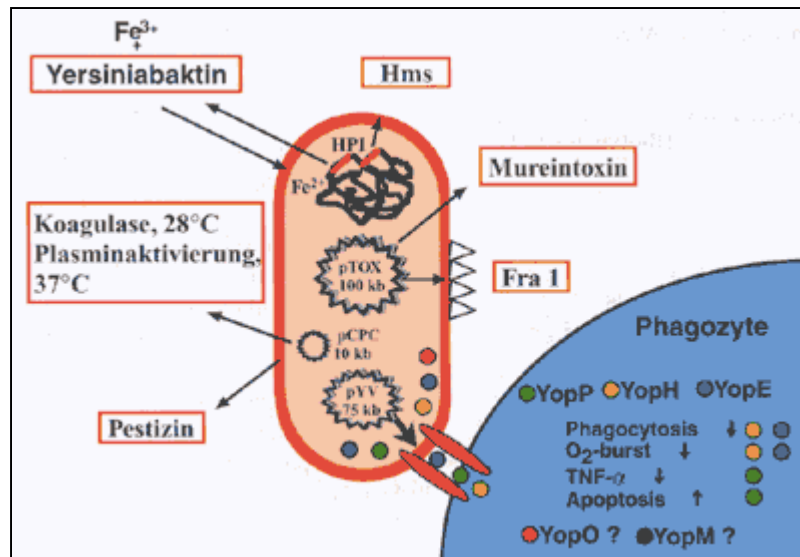
Schon früh war Mikrobiologen aufgefallen, dass frische Pestisolate auf festen Nährböden bei 37° C viel langsamer wachsen als bei 28° C, dass wenigstens zwei Kolonietypen mit dem Auge erkennbar sind sowie dass die größeren flachen Kolonien für Nagetiere viel weniger virulent sind als die runden Formen mit dem glatten Rand. Darüber hinaus konnte auch beobachtet werden, dass die virulenten Formen Hämin oder Kongorot (Kongorot-Agar) speichern, was zur Bezeichnung des Phänotyps „Pigmentation“ (Pgm) führte (Abb. 2).

Abbildung 2: *Y. pestis* aus einer Stammsammlung wurde auf Kongorot-Agar ausgestrichen und 3 Tage bei 28° C inkubiert. Die rot pigmentierten Kolonien sind Pgm-positiv und können Hämin speichern. Die blassen Kolonien haben den *pgm*-locus deletiert.



Virulente *Y. pestis* zeigen ein kalziumabhängiges Wachstum bei 37° C. Wird durch Zugabe von Magnesiumchlorid/Natriumoxalat (10 mM/10 mM) dem Nähragar Kalzium entzogen (MOX-Agar, Präzipitation von Ca-Oxalat), wachsen die avirulenten *Y. pestis* bei 37° C nach 24 Std. zu sichtbaren Kolonien heran, während die virulenten Yersinien nur mikroskopisch zu erkennen sind [1]. Bei 28° C wachsen beide Formen auf MOX-Agar gleich gut. Dieses Phänomen wird auch bei virulenten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* beobachtet. Verantwortlich für diesen Phänotyp ist das 70 Kilobasen große Virulenzplasmid pYV, das bei allen drei Yersinia-Arten vorkommt. Dieses Virulenzplasmid kodiert für ein Protein-Typ III-Sekretionssystem, das die Yersinien befähigt, Pathogenitätsfaktoren (die sog. Yersinia outer proteins, Yops) an der Erreger-Wirtzell-Kontaktzone in das Zytoplasma zu translozieren [1]. Einige dieser Yops und ihre zellulären Funktionen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung von *Y. pestis* mit den drei Virulenzplasmiden und der kontaktinduzierten Yop-Translokation (Proteinsekretion-Typ III)



Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Yops die Signaltransduktionskaskade, die normalerweise nach Kontakt mit Bakterien zur Aktivierung der Zelle führt (z.B. Phagozytose, Sauerstoffradikalbildung, TNF-alpha-Produktion), hemmen und Makrophagen durch Apoptoseinduktion abtöten [6]. Darüber hinaus induziert das lange bekannte V-Antigen von *Y. pestis* IL-10 in Makrophagen, was zur Immunsuppression führt [7]. *Y. pestis* trägt noch zwei weitere Plasmide: pTOX ist ein 100 Kb großes Plasmid, das für ein mausspezifisches Toxin (Mtx, Lipase D) und ein Kapselprotein (Fraktion 1, Fra 1) kodiert. Die Lipase D benötigen die Pestbakterien zum Überleben und Vermehren im Flohmagen. pCPC ist 10 Kb groß und kodiert für eine temperaturabhängige Protease, die Plasminogen bei 37° C aktiviert und Fibrinbildung bei 28° C induziert. Der Proteaseaktivität wird eine pathogenetische Bedeutung bei der subkutanen Disseminierung zugeschrieben. Auf pCPC ist auch das Gen, für das Bacteriocin Pestizin lokalisiert, das auf *Yersinia pseudotuberculosis* Serotyp I, *Y. enterocolitica* Biotyp I B sowie bestimmte *E. coli*-Stämme bakterizid wirkt [8].

In der Natur kommen *Y. pestis*-Stämme mit allen möglichen Plasmidkombinationen vor. Im Labor erweisen sich besonders die zwei großen Plasmide bei 37° C Anzuchttemperatur als instabil (spontane Konversion zu avirulenten Stämmen). Eine weitere genetische Instabilität ist auf dem Chromosom lokalisiert, die im Zusammenhang mit Verlust der Virulenz, der Pestizinempfindlichkeit und des Pigmentationsphänotyps steht [1, 8, 9]. Auf einem etwa 100 Kb großen Bereich auf dem Chromosom befinden sich Gencluster, die für Häminspeicherung (hms-locus) und für Siderophorbiosynthese (Yersiniabaktin) und Aufnahme sowie Pestizinempfindlichkeit (irp/fyuA-locus) kodieren. Dieser Bereich trägt zahlreiche IS-Elemente, die wahrscheinlich für spontane Deletionen und damit für Verlust der genannten Phänotypen sorgen. Der infektiobiologische oder mikroökologische Sinn der genetischen Instabilitäten der Virulenzgene bei *Y. pestis* ist unklar.

Genesequenzvergleiche zwischen den humanpathogenen Yersinia-Arten haben nicht nur deutlich gemacht, dass *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* phylogenetisch zu einer Bakterienart gehören, sondern auch, dass *Y. pestis* vor 1.500 bis 30.000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis*, Serotyp 01, entstanden ist [10]. Die Genomsequenz von *Y. pestis* hat diesen evolutionären Zusammenhang bestätigt und darüber hinaus gezeigt, dass über 149 Gene, die in *Y. pseudotuberculosis* aktiv sind, in *Y. pestis* durch Insertionselemente oder Punktmutationen inaktiviert sind [11].

Ökologie und Epidemiologie

Bei der Pest handelt es sich um eine Zoonose von Nagetieren, die durch Flöhe übertragen wird. Der Rattenfloh (*Xenopsylla cheopsis*) infiziert sich durch Blut von septikämischen Ratten. *Y. pestis* kann im Vormagen des Flohs überleben und das Blut koagulieren. Wahrscheinlich führt dieser Zustand den Floh zu erneuter Blutmahlzeit. Nach dem Stich wird der infektiöse Mageninhalt herausgewürgt. Auf diese Weise wird der Pesterreger auf andere Wirte (Nagetiere, Haustiere, Menschen u. a.) übertragen. Je nach Widerstandsfähigkeit des Wirtes können Flöhe den Pesterreger dann weiter verbreiten.

Zu den typischen Nagetieren in Wildpestgebieten gehören Ratten, Feldmäuse, Ziesel, Erdhörnchen u. a. Pestepidemien treten in der Regel dann auf, wenn der Pesterreger in urbane Rattenpopulationen einbricht und eine Epizootie auslöst. Die infizierten Rattenflöhe können dann Haustiere und Menschen befallen. Von der Stichstelle aus gelangt der Pesterreger in die nächstgelegenen Lymphknoten (z.B. untere Extremität, Inguinallymphknoten). Innerhalb von 2 bis 6 Tagen entwickelt sich eine schmerzhafte Lymphadenitis (Bubo) mit starker Schwellung und schwerem Krankheitsgefühl. Die WHO hat die bekannten Wildpestherde und die gemeldeten Pestfälle weltweit registriert [2]. Wie in Tabelle 3 dargestellt, kommen die häufigsten Pestfälle in Tansania, Vietnam, Zaire, Peru, Madagaskar und Birma (Myanmar) vor. Aber auch in den Südweststaaten der USA (New Mexico, Arizona, Colorado, Kalifornien) werden ca. 10 bis 20 Pestfälle pro Jahr registriert. (In Tab. 3 sind nur diese Länder aufgeführt.) Besonders häufig werden Pestfälle in den warmen Sommermonaten während des Vermehrungsmaximums der Flöhe und der Wurfzeit der Nagetierpopulation im Pestherd gemeldet.

Die Beulenpest beim Menschen muss nicht ansteckend sein, solange der Patient keine Pestseptikämie mit nachfolgender Pestpneumonie entwickelt. Pestpneumonien sind hoch infektiös, der Erreger kann dann durch Tröpfchen übertragen werden. Wahrscheinlich liegt die Infektionsdosis bei 1 - 10 Erregern. Eine Pestpneumonie kann in 2 Tagen zum Tode führen. Bei den 390 Pestfällen in den USA im Zeitraum 1947 bis 1996 handelte es sich in 83,9% um Beulenpest (Letalität: 13,5%), 12,6% um primäre Pestseptikämien (Letalität: 22,4%) und um 1,8% Lungenpest (Letalität: 57%) [12].

Besonders erwähnenswert ist eine Zunahme der Pestfälle in den letzten Jahren und das Auftreten von multiresistenten Erregern. In den Jahren 1980 - 1989 wurden im Jahresdurchschnitt 861 Pestfälle registriert, während in den Jahren 1990 - 1994 der Jahresdurchschnitt bei 2.025 Fällen lag [2].

Tabelle 3: Gemeldete Fälle an Pestkranken und -toten 1980 - 1994 (WHO, 1996)

Kontinent	Erkrankte	Tote
Afrika	10.155	1.344
Madagaskar	1.390	302
Tansania	4.964	419
Zaire	2.242	531
Amerika	2.923	184
Brasilien	700	9
Peru	1.722	112
USA	229	33
Asien	5.661	325
Indien	876	54
Myanmar	1.160	14
Vietnam	3.304	158
Total	18.739	1.853

1995 wurde in Madagaskar bei einem Jugendlichen mit Beulenpest ein multiresistenter *Y. pestis*, *Biovar orientalis* isoliert, der ein konjugatives Plasmid der Inc6-C-Gruppe mit Resistenzgenen gegen Betalaktam-Antibiotika, Chloramphenicol, Tetracyclin, Kanamycin, Streptomycin, Spectinomycin und Sulfonamide trägt. Dieser Stamm erwies sich *in vitro*

noch empfindlich für Cephalosporine, Gentamicin, Chinolone und Trimethoprim. Der Patient überlebte nach Therapie mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol.

Klinik

Die Pest manifestiert sich in drei unterschiedlichen Krankheitsbildern.

1. Beulenpest:

Ausgehend vom Ort des Flohstiches entwickelt sich eine schmerzhaftes Lymphknotenschwellung inguinal, axillar oder cervikal innerhalb von 2 bis 6 Tagen, verbunden mit schwerem Krankheitsgefühl (hohes Fieber, Durchfall, Erbrechen, Verwirrtheit, Kopfschmerzen, Schüttelfrost). Erreger sind häufig in Blutkulturen und Bubo-Aspirat nachweisbar (10-10⁷ Erreger pro ml Blut).

2. Primäre Pestsepsis:

Bei etwa 10% der Pestinfizierten entwickeln sich keine Bubonen, sondern die Infektion führt primär zu einem septischen Krankheitsbild (im Unterschied zur sekundären Sepsis bei Beulenpest) mit schweren gastrointestinalen Beschwerden.

3. Lungenpest:

Die Lungenpest kann sich sekundär aus der Pestbakteriämie z.B. nach Beulenpest oder Pestsepsis entwickeln oder primär durch Aufnahme des Erregers über die Atemluft (Tröpfcheninfektion, *Y. pestis*-kontaminierter Staub von infizierten Tieren). Nach einer sehr kurzen Inkubationszeit von 1 bis 3 Tagen entwickelt sich ein schweres Krankheitsbild mit blutigem Sputum, Pneumonie und septischen Temperaturen. Wenn nicht innerhalb von 12 bis 18 Stunden eine adäquate Antibiotika-Therapie eingeleitet wird, endet die Pestpneumonie in der Regel tödlich. Im Gegensatz zur Beulenpest sind die Pneumonien Patienten hoch infektiös. Kontaktpersonen sollten Mundschutz, Schutzbrille, Haube, Schutzkittel und Handschuhe tragen und prophylaktisch Antibiotika (z.B. Minocyclin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol) einnehmen.

Diagnostik

Eine Infektion mit *Yersinia pestis* setzt in der Regel einen Aufenthalt in einem Pestenzootiegebiet voraus. Dies ist bei der Anamneseerhebung zu berücksichtigen. Differentialdiagnostisch kommen bei fehlendem Bubo z.B. Malaria, Q-Fieber, Typhus, Fleckfieber, Brucellose und bei Lymphknotenschwellung oder Ulzeration z.B. Diphtherie und Tularämie in Frage.

Bei Verdacht auf Pest sollten Kulturen von Bubonen-Aspirat, Blut (2 bis 3 Blutkulturen innerhalb von 60 min) und ggf. Sputum oder Liquor angesetzt werden (Blutagar, BHI-Agar, Mac-Conkey-Agar, Inkubation bei 28° C bis 48 Stunden). Obligat ist die Anfärbung von Patientenmaterial nach Gram und Wayson (oder Methylenblau), um die typischen sicherheitsnadelförmigen Pestbakterien mikroskopisch zu identifizieren. Da die meisten Pesterreger das F1-Kapselprotein produzieren, können die Erreger mittels Anti-F1-Serum in der Immunfluoreszenz spezifisch dargestellt werden. Neuerdings können auch molekularbiologische Methoden wie PCR und In-situ-Hybridisierung mit fluoreszierenden r-RNA-spezifischen Proben (FISH-Technik) zum Direktnachweis von Pestbakterien herangezogen werden [13]. Auch der Nachweis von F1-Antigen im Blut mittels ELISA

gehört zur Schnelldiagnostik der Pest, wogegen die serologische Diagnostik (z.B. Nachweis von Serumantikörpern gegen F1-Antigen) mehr von retrospektiver und epidemiologischer Bedeutung ist [1]. Hier sollte erwähnt werden, dass *Y. pestis*-Isolate nicht selten als *Y. pseudotuberculosis* falsch identifiziert wurden [1, 12]. Der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod an Pest sind meldepflichtig.

Therapie und Prophylaxe

Für das Überleben des Pestpatienten sind eine schnelle Diagnose und eine sofortige Antibiotikatherapie entscheidend. Penicilline und Cephalosporine haben sich für die Therapie der Pest als ineffizient erwiesen. Das wirksamste Antibiotikum ist bis heute Streptomycin geblieben. Bei Pestmeningitis oder Streptomycin-Kontraindikation ist eine Chloramphenicol-Therapie angezeigt. Auch Doxycyclin hat sich als wirksam erwiesen. In Tabelle 4 sind die anerkannten Therapieprotokolle angegeben. Patienten mit Verdacht auf Pestpneumonie müssen nach Beginn der Antibiotikatherapie mindestens weitere 48 Stunden isoliert werden.

Tabelle 4: Empfehlungen für Therapie und Prophylaxe

Therapie (8-10 Tage)	Tagesdosis	Applikation	Dosierungsintervall (h)
Streptomycin Gentamicin	30 mg/kg/KG	i . m.	8 - 12
Erwachsene	3 - 5 mg/kg/KG	i. v. / i. m.	8
Kinder	6 - 7 mg/kg/KG	i. v. / i. m.	8
Tetracyclin (Erwachsene)	2 g	p. o.	6
Doxycyclin	200 mg (initial) 100 mg	p. o. p. o.	12 12
Chloramphenicol	25 mg/kg/KG (initial) 50 mg/kg/KG	i. v.	6
Prophylaxe (7 Tage)			
Doxycyclin	100 - 200 mg	p. o.	12
Trimethoprim- Sulfamethoxazol	1,6 - 3,2 g	p. o.	12

Medizinisches Personal und andere Personen, die Kontakt mit Pestpatienten haben, sollen prophylaktisch Tetracyclin/Doxycyclin oder Trimethoprim-Sulfamethoxazol für 7 Tage einnehmen.

Eine Impfung mit Totvakzinen ist nicht empfehlenswert. Bei Aufenthalt in Wildpestherden sind Schutzmaßnahmen gegen Flohstiche (entsprechende Bekleidung, Flohrepellent u. a.) und ggf. eine Antibiotikaprophylaxe empfehlenswert. Trotz aller neuen Erkenntnisse zur Pest und Pesttherapie gilt auch weiterhin das Camus-Zitat (aus Die Pest):

"Denn er wusste, was dieser frohen Menge unbekannt war und was in den Büchern zu lesen steht: dass der Pestbazillus niemals ausstirbt oder verschwindet ..."

Gewinnung des Bubonen-Aspirats und Färbung nach Wayson

1. 1 ml Spritze mit 1 ml Kochsalzlösung (steril)
2. Einstich in Bubo und Aspiration von blutiger Spülflüssigkeit (häufig kein flüssiger Eiter vorhanden).
3. Aspirattropfen auf Objektträger ausstreichen, lufttrocknen und mit absolutem Alkohol fixieren.
4. Wayson-Färbung (0,2 g basisches Fuchsin plus 0,75 g Methylenblau) in 20 ml Äthylalkohol (95%) lösen und langsam in 200 ml einer 5%igen Phenollösung einrühren und filtrieren.
5. Wayson-Färbelösung 10 - 20 Sekunden auf fixierten Ausstrich einwirken lassen, mit Wasser waschen und trocknen.

Literatur:

1. Perry R.D., Fetherston J.D.: „Yersinia pestis – Etiologic Agent of Plague.“ Clin. Microbiol. Reviews 10 (1997) 35-66.
2. „Prevention of Plague.“ Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) MMWR 45 (RR-14): (1996) 1-15.
3. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rasamanana B., Chanteau S., Carnie E., Courvalin P.: „Multidrug Resistance in Yersinia Pestis Mediated by a Transferable Plasmid.“ N. Engl. J. Med. 337 (1997) 667-680.
4. Ibrahim A., Goebel B.M., Liesack W., Griffiths M., Stackebrandt E.: „The phylogeny of the genus Yersinia based on 16S rDNA sequences.“ FEMS Micro. Letters 114 (1993) 173-178.
5. Rakin A., Heesemann J.: „The established Yersinia pestis biovars are characterized by typical patterns of I-CeuI restriction fragment length polymorphism.“ Mol. Genet. Microbiol. Virusol. 3 (1995) 26-29.
6. Ruckdeschel K., Harb S., Roggenkamp A., Hornef M., Zumbihl R., Köhler S., Heesemann J., Rouot B.: „Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF- κ B: Involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage TNF- α production.“ J. Exp. Med. 187 (1998) 1069-1079.
7. Sing A., Roggenkamp A., Geiger A.M., Heesemann J.: „Yersinia enterocolitica Evasion of the Host Innate Immune Response by V Antigen-Induced IL-10 Production of Macrophages Is Abrogated in IL-10-Deficient Mice.“ J. Immunol. 168 (2002) 1315-1321.
8. Rakin A., Saken E., Harmsen D., Heesemann J.: „The pesticin receptor of Yersinia enterocolitica: a novel virulence factor with dual function.“ Mol. Microbiol. 13 (1994) 253-263.
9. Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J.: „Prevalence of the “High-Pathogenicity Island“ of Yersinia Species among Escherichia coli Strains That are Pathogenic to Humans.“ Infect. Immun. 66 (1998) 480-485.
10. Achtmann M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E.: „Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 14043-14048.
11. Parkhill J. et al.: „Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague.“ Nature 413 (2001) 523-527.
12. Anonymus: „Fatal Human Plague – Arizona and Colorado, 1996.“ MMWR 46 (1997) 617-620.

13. Hinnebusch J., Schwan T.G.: „New Method for Plague Surveillance Using Polymerase Chain Reaction To Detect Yersinia pestis in Fleas.“ J. Clin. Microbiol. 31 (1993) 1511-1514.

14. Trebesius K.-H., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J.: „Development of rRNA targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of Yersinia species.“ J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 2557-2564.

Anschrift der Verfasser:

Prof. DDr. J. Heesemann, Dr. A. Rakin

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

D-80336 München, Pettenkoferstraße 9a

E-Mail: heesemann@m3401.mpk.med.uni-muenchen.de, rakin@m3401.mpk.med.uni-muenchen.de

[zurück zum Inhalt](#)

Plague in Southern Caucasus

D. Tsereteli 1, L. Bakanidze 1, I. Velijanashvili 1, L. Beridze 1, M. Manrikyan 2, M. Shakhikyan 2, M. Kekelidze 1, E. Zangaladze 1, N. Tsertsvadze 1, P. Imnadze 1

1 National Center for Disease Control, Tbilisi, Georgia

(Director: P. Imnadze, Ph.D., M.D.)

2 Center for Prevention of Particularly Dangerous Infections, Yerevan, Armenia

(Director: Dr. M. Manrikyan)

- **Key-words**
 - **Summary**
 - **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Introduction**
 - **Materials and Methods**
 - **Results and Discussion**
 - **References**
-

Key-words:

Plague, *Yersinia pestis*, PCR, natural foci

Summary

There are three natural foci of plague on the territory of Georgia and Armenia: plain-foothills, high-mountainous and Araks-side. High-mountainous focus includes the southern part of Georgia and the eastern part of Armenia. Conventionally by state border it is divided into two parts. Strains of *Y. pestis* isolated from high-mountainous focus differ from strains of *Y. pestis* isolated in plain-foothills and Araks-side foci. In this study 21 strains of *Y. pestis*, isolated from high-mountainous focus, 1 strain of *Y. enterocolitica* and 2 strains of *Y. pseudotuberculosis* were tested by PCR. All 21 strains of *Y. pestis* produced amplicons in the V antigen gene PCR. 19 of them produced amplicons in the F1 capsular antigen gene PCR, 2 strains were negative. All strains lacked pPLA antigen gene.

Schlüsselwörter:

Pest, *Yersinia pestis*, PCR, Naturherd

Zusammenfassung

Auf dem Territorium von Georgien und Armenien finden sich drei unterschiedliche Naturherde für Pest: Ebenen/Hügellandschaften, Hochgebirge und Gebiete am Fluss Arax. Hochgebirgsherde sind im südlichen Georgien und im östlichen Armenien platziert. *Yersinia pestis*-Isolate von Hochgebirgsherden unterscheiden sich klar von Isolaten, welche aus Naturherden in Ebenen/Hügellandschaften oder Gebieten am Fluss Arax stammen. Wir untersuchten 21 Hochgebirgs-Isolate von *Yersinia pestis* im Hinblick auf Virulenzgene. *Yersinia enterocolitica* (1 Isolat) und *Yersinia pseudotuberculosis* (2 Isolate) wurden als Kontrollstämme verwendet. Mittels PCR konnte bei allen *Yersinia pestis*-Isolaten das Gen für das V-Antigen nachgewiesen werden. Bei 19 dieser Isolate konnte Plasmid-Nukleinsäure nachgewiesen werden, die das F1-Kapselantigen codiert. Allen Isolaten fehlte das pPLA-Antigen; die Abwesenheit dieses Virulenzfaktors gilt als Besonderheit der *Yersinia pestis*-Isolate des südlichen Kaukasus.

Introduction

Yersinia pestis is one of the most devastating infectious agents in the world. Cases of plague were described starting from the pre-Christian era. Despite of major advances made in the knowledge of the disease, plague has not been eradicated yet. Today, in the perspective of the last events the threat of bioterrorism made the society more sensitive to those infectious agents, which can be used as a biological weapon. And plague is one of the main threats of bioterrorism.

Plague in Georgian manuscripts first is mentioned in the XI century. Here clinical manifestations – bubonic form, epidemic character in densely populated areas are described. Later, in the XV century, in another Georgian manuscript, the „Book of Medical Treatment-Karabadini“, more detailed information on plague is given, particularly, the clinical manifestation of bubonic form is described. In 1616 cases of plague were described in western Georgia, probably brought in by catholic missioners. In Georgian folklore plague is named „zhami“ (in old Georgian it means „bad time“). Historically it was well-known that the population from different mountainous regions of Georgia had schistose tombs, very characteristic for given places – mud-huts, towers, etc. These tombs were used for the isolation of people with plague. If the isolated person died, his remains stayed in the tomb unburied, while the other sick persons could stay there at the same time. According to folklore, these tombs, so-called „anatoras“, first were built by inhabitants of the village Anatori, and were emptied by plague in the beginning of the XIX century. The last outbreak of plague took place in 1910, in Batumi – one of the main ports of Georgia, at the Black Sea. In the 1970s four tombs from Khevsureti (Southeast Caucasus) were investigated on the existence of a specific plague antigen. *Y. pestis* antigen F1 was found in two samples of bone remains from these „anatoras“ [3]. In 2001 we have found some anatoras at the altitude of 2.500 m above sea level on the south slope of Big Caucasus, near the border with Chechnya (Fig. 1). Most of the anatoras (characteristic not only for Georgians, but other Caucasian ethnic groups as well) were destroyed during military actions in the region.

Fig. 1.: Tomb „Anatora“ in Caucasian mountains (altitude 2.500 m above sea level)



Materials and Methods

Materials for the investigation were taken from live rodents and rodent remains from locations of epizootics: parts of spleen, liver, lungs, pathologically changed lymph nodes,

bone marrow and brain. Fleas and ticks were combed out, and collected in burrows. Suspected on plague, material was investigated by microscopy, cultivation on elective media, serology and infecting laboratory animals. Isolated cultures were investigated by bacteriological, biochemical and biological methods. All the strains were analyzed by PCR that was performed using ready-to-go analysis beads („Pharmacia Biotech“). Bacterial DNA for PCR was derived by the standard methodology [1]. The primer pairs used for identifying F1 capsular antigen gene and for V antigen gene were as described [2]. PCR for F1 capsular antigen gene was performed using the following cycle profile: 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 35 cycles (95°C - 1 min, 55°C - 1 min, 72°C - 5 min), 1 cycle at 72°C for 5 minutes. PCR for V antigen gene used the following cycle profile: 1 cycle at 94°C for 10 minutes, 30 cycles (94°C - 1 min, 60°C - 1 min, 72°C - 1 min), 1 cycle at 72°C for 10 minutes. PCR for pPLA antigen gene was performed using the following cycle profile: 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 35 cycles (95°C - 1 min, 55°C - 1 min, 72°C - 5 min), 1 cycle at 72°C for 5 minutes.

Results and Discussion

There are three natural foci of plague on the territory of Georgia and Armenia: plain-foothills, high-mountainous and Araks-side. Plain-foothills focus includes the eastern part of Georgia and Azerbaijan territories near the Azerbaijan-Georgia border. Epizootics of plague in the Georgian part of this focus were registered in 1966 and 1968-1971 [3, 4]. The main reservoir of plague in these foci is *Meriones erythrorus (libicus)*, the main vector – *Xenopsylla conformis* and *Ceratophyllus laeviceps*. Totally 83 strains were isolated: 30 strains from rodents and 53 strains from the vectors. High-mountainous focus includes the southern part of Georgia and the eastern part of Armenia. Conventionally by state border it is divided into two parts. High-mountainous focus of southern Caucasus first was identified in 1958, when the *Y. pestis* strain was isolated from *Microtus arvalis* in the Giumri neighborhood. In the Armenian part of this focus every year in the period of 1958-1988 there were epizootics of plague of different intensity. It must be mentioned that after the earthquake in Armenia in 1988 and until the end of the 1990s epizootic processes decreased in the Armenian part of the focus, and reservoirs and vectors of plague were heavily depressed. Beginning from the year 2000, epizootic processes are activated. In the Georgian part of the focus epizootics of plague were identified in the years 1979-1983 and 1992-1997. The main reservoir in this focus was *Microtus arvalis*, the main vector – *Callopsylla caspia*, *Nosopsyllus consimilis*. From 39 strains isolated 5 strains were from rodents and 34 from vectors. In 1971 Araks-side focus of plague was identified. The main reservoir in this focus was *Meriones vinogradovi*, the main vector – *Xenopsylla conformis* and *Callopsylla iranicus*. Strains of *Y. pestis* isolated from high-mountainous focus differ from strains of *Y. pestis* isolated in plain-foothills and Araks-side foci by several characteristics: they ferment ramnose during 48 hours, are less virulent or avirulent for guinea pigs, do not produce pesticin, but are sensitive to it.

Pathogenic *Y. pestis*-isolates are characterized by the presence of three different plasmids. The *Y. pestis* - specific 9,5 kbp plasmid pPla carries the plasminogen activator/coagulase and pesticin genes [2, 9]. The other *Y. pestis*-specific plasmid is pFra, 110 kbp in size. The highly immunogenic fraction F1-capsular antigen and the murine toxin are well-studied proteins encoded by this plasmid. The third plasmid is 70 kbp in weight and is shared by all pathogenic members of the species *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. It contains a number of highly conserved virulence marker genes, and codes for the V antigen, a factor in *Yersinia* supposed to influence the inflammatory

response [1, 8]. Only the 70 kb plasmid is shared among the pathogenic yersinia [5, 7].

In this study 21 strains of *Y. pestis*, isolated from high-mountainous focus, 1 strain of *Y. enterocolitica* and 2 strains of *Y. pseudotuberculosis* were tested by PCR. All 21 strains of *Y. pestis* produced amplicons in the V antigen gene PCR (Fig. 2). 19 of them produced amplicons in the F1 capsular antigen gene PCR, 2 strains were negative (Fig. 3). All strains lacked pPLA antigen gene. This finding correlates with the data that strains from Transcaucasian Alpines and Daghestan Mountains are exceptions – they do not consist of 9,5 kbp pPLA [6]. 2 strains of *Y. pseudotuberculosis* and the strain of *Y. enterocolitica* did not produce amplicons in any of three – V, F1 and pPLA antigens gene PCR. Further studies of these strains (PFGE) will show the correctness of these findings.

Fig. 2: V antigen gene PCR. 1-20 and 22 are *Y. pestis*-strains, 21 and 23 are *Y. pseudotuberculosis*-strains, 24 *Y. enterocolitica*-strain

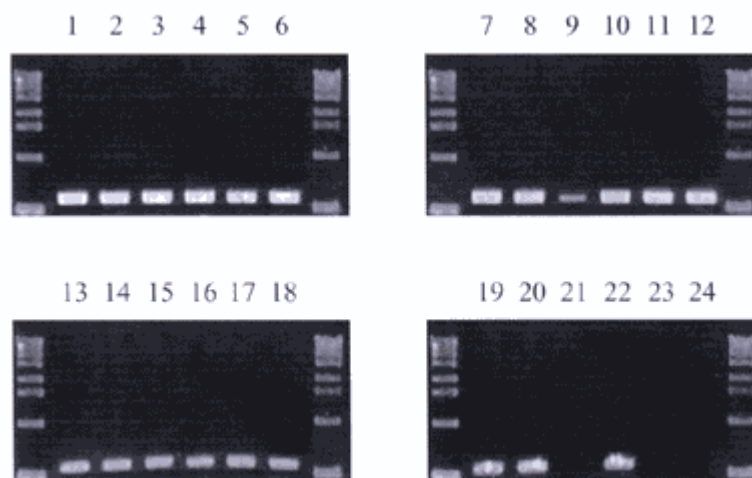
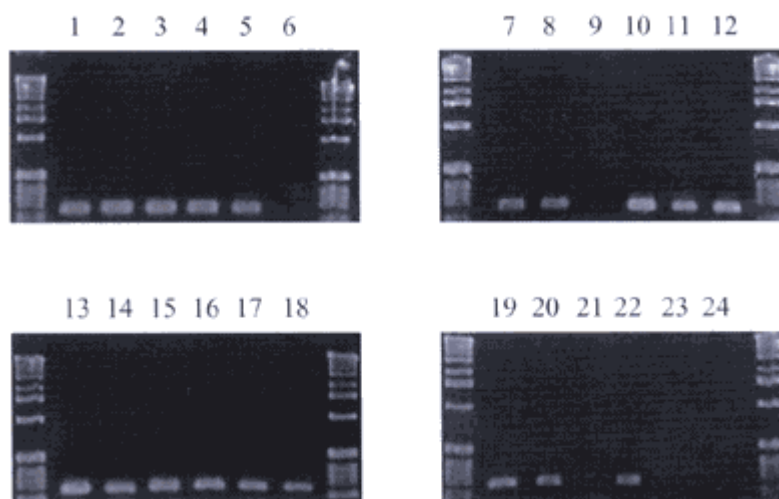


Fig. 3: F1 antigen gene PCR. 1-20 and 22 are *Y. pestis*-strains, 21 and 23 are *Y. pseudotuberculosis*-strains, 24 *Y. enterocolitica*-strain



References:

1. Brubaker B.: „The V antigen of Yersiniae: an overview.“ In: Une T., Maruyama T. and Tsubokura M. (eds), Current Investigations of the Microbiology of Yersiniae. Karger, Basel (1991) 127-133.

2. Campbell J., Lowe J., Walz S., Ezzell J.: „Rapid and specific identification of *Yersinia pestis* by using a nested polymerase chain reaction procedure.“ *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 758-759.
3. Cherchenko I., Dzebisashvili Iu., Nersesov V., Oganyan E., Magradze G., Mchedlidze G., Velijanashvili I.: „Detection of the Specific Plague Antigen F1 in the Soil from the Tombs of the 19th Century in the Caucasus. Problems of Particularly Dangerous Infections (annals of the Plague Prevention Institutions of the USSR.“ *Saratov*, 6 (1973) 107-108.
4. Chkheidze G., Dzebisashvili Iu., Nersesov V., Jmukhadze I.: „Natural Foci of Plague on the Territory of Georgia. J. Particularly Dangerous Infections in Caucasus.“ *Stavropol.* 1 (1974) 70-72.
5. Chu M.C.: „Laboratory Manual of Plague Diagnostic Tests.“ CDC – WHO. (2000) 10-40.
6. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kookleva L.M., Prostenko O.A.: „Plasmid Content in *Yersinia pestis*-strains of different origin.“ *FEMS Microbiol. Lett.* 67 (1990) 45-48.
7. Neubauer H., Meyer H., Prior J. et al.: „A Combination of Different Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays for the Presumptive Identification of *Yersinia Pestis*.“ *J. Vet. Med. B* 47 (2000) 573-580.
8. Price S.B., Leung K.Y., Brave S.S., Straley S.C.: „Molecular analysis of *lcrGVH*, the V antigen operon of *Yersinia pestis*.“ *J. Bacteriol.* 171 (1989) 5646-5653.
9. Podzorsli R.P., Kukuruga D.L., Long P.M.: „Introduction to Molecular Methodology.“ *Manual of Clinical Immunology*, 5th Ed., Washington, DC; ASM Press (1997) 77-107.

Corresponding author:

D. Tsereteli Ph. D., M.D.
National Center for Disease Control
9, Asantiani St, Tbilisi 380077, Georgia
E-Mail: rabdato@yahoo.com

[zurück zum Inhalt](#)

Anthrax in Southern Caucasus

P. Imnadze 1, L. Bakanidze 1, M. Manrikyan 2, T. Kukhalashvili 1, E. Zangaladze 1, M. Kekelidze 1, D. Tsereteli 1, M. Nadiradze 1, Sh. Tsanova 1, N. Tsertsvadze 1

1 National Center for Disease Control, Tbilisi, Georgia

(Director: P. Imnadze, Ph.D., M.D.)

2 Center for Prevention of Particularly Dangerous Infections, Yerevan, Armenia

(Director: Dr. M. Manrikyan)

- **Key-words**
 - **Summary**
 - **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Introduction**
 - **Materials and Methods**
 - **Results and Discussion**
 - **References**
-

Key-words:

Anthrax, *B. anthracis*, AP-PCR

Summary

In the last years a significant increase in the number of anthrax cases was detected in the whole South Caucasus region. Anthrax in Georgia and Armenia is characterized by marred seasonal prevalence – the end of spring and in early autumn register 93 per cent of cases. The disease cases were registered in cattle and humans as well as an appearance of recently infected fields has been observed. After 1989 only one patient was registered with the intestinal form of the disease, all others had cutaneous form.

During the last 13 years in countries of Southern Caucasus 35 strains of *B. anthracis* were isolated (among them 17 from humans, others from beef, cattle skin, animal hair and soil). Isolated strains are of high virulence. AP-PCR identified a relationship among the tested isolates. The genetic profiles of 23 *B. anthracis* strains were identical to each other. One strain isolated in 1989 from the burial site has a distinguished genetic profile.

Schlüsselwörter:

Anthrax, *Bacillus anthracis*, AP-PCR

Zusammenfassung

In den letzten Jahren musste im ganzen südlichen Kaukasus ein deutlicher Anstieg der Inzidenz von Anthrax festgestellt werden. In Georgien und Armenien zeigt das Auftreten von Anthrax eine charakteristische jahreszeitliche Verteilung: 93% der Fälle finden sich im späten Frühling und im frühen Herbst. Mit Ausnahme eines Falles von Darmmilzbrand manifestierten sich alle Humanerkrankungen (Auswertung seit 1989) als Hautmilzbrand.

In den letzten 13 Jahren wurde im südlichen Kaukasus 25-mal *Bacillus anthracis* isoliert (in 17 Fällen aus humanem Untersuchungsmaterial;

die restlichen Isolate stammen aus Rindfleischproben, Rinderhäuten, Tierhaaren und Erdproben). Alle Isolate erwiesen sich im Mäuseversuch als virulent. Mittels AP-PCR wurden 24 *Bacillus anthracis*-Isolate subtypisiert. Mit Ausnahme eines Stammes, welcher im Jahr 1989 aus Bodenproben von einem bekannten Wasenplatz kultiviert wurde, zeigten alle Stämme ein einheitliches genetisches Profil.

Introduction

Anthrax is an acute infectious disease, and its eradication or control is one of the main goals of Public Health and veterinary. Recent events in US, wide use of anthrax, as the agent of biological terrorism, increased the interest in this pathogen. Combating the infection, reducing potential sources of it, and carrying out timely measures is very important worldwide.

Anthrax in Georgia is well known from the middle of the centuries. Even in 1697 the famous Georgian writer Sulkhan-Saba Orbeliani describes this disease as very acute and dangerous. During the 20th century increase in anthrax morbidity was seen in the years 1924-1925 and 1941-1945.

Materials and Methods

Anthrax was diagnosed based on clinical, epidemiological and laboratory data. Laboratory investigation consists of microbiological methods [1]. Skin lesions, materials from cattle, environmental samples were tested. Main method for laboratory diagnostics of anthrax was microbiological (microscopy, seeding on media, bioprobes on laboratory animals), serological and allergic methods were used as well. *B. anthracis* was isolated by growth on beef-peptone agar and beef-peptone broth pH 7,2. After incubation in 37°C for 24 hours typical for *B. anthracis* growth was seen both on solid and liquid media. *B. anthracis* was identified by a number of specific characteristics: morphology of microbial cells, character of growth in broth, mobility, hemolytic activity, coagulation of egg protein and pathogenicity for laboratory animals (white mouse). AP-PCR was performed using a RAPD Kit containing ready-to-go analysis beads („Amersham“). Primer # 5 of the kit (5-AAC GCG CAAC-3) was superior to the other primers examined. Therefore all subsequent AP-PCR was performed using this primer. Bacterial DNA for AP-PCR was derived by the standard methodology. AP-PCR was performed using the following cycle profile: 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 45 cycles (95°C - 1 min, 36°C - 1 min, 72°C - 2 min), 1 cycle at 72°C for 5 min.

Results and Discussion

In the last years a significant increase in the number of anthrax cases was detected in the whole South Caucasus region. During 1996-2001 in Georgia 153 cases of anthrax were registered, in Armenia 41 cases. 64% of patients with anthrax are men, the disease prevails in age groups 31-40 years (31%) and 41-50 years (26%). Anthrax in Southern Caucasus is characterized by marred seasonal prevalence – the end of spring and in early autumn register 92,6 per cent of the cases. The disease cases were registered in cattle and humans as well as appearance of recently infected fields has been observed. After 1989 only one patient was registered with the intestinal

predominantly on hands (97% of cases) (Fig. 1). In one case the skin lesion was on the nose (Fig. 2). The main source of infection with anthrax is infected live-stock (among them cattle in 84,3%, small cattle 14,2%, horses 0,8% and pigs 0,7% of cases). The disease cases were registered in cattle and humans as well as appearance of recently infected fields has been observed [2]. In 2001 17 cases of anthrax were registered in humans in western Georgia. During the same year in Armenia 18 human anthrax cases were registered. All were cutaneous forms.

Fig. 1: Skin lesion on the hand



Fig. 2: Skin lesion on the nose



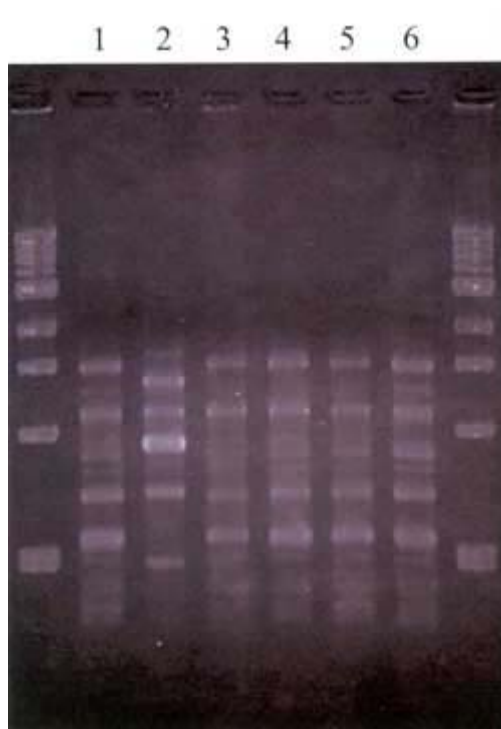
The main reason of infecting humans and cattle with anthrax today is:

- 1) incomplete vaccination of cattle;
- 2) lack of effective methods of sanitation of soil foci;
- 3) insufficient veterinary and sanitary conditions of burial sites.

During the last years permanent soil foci arose on the territories of several regions in Georgia as well as in Armenia. During the last 13 years in countries of Southern Caucasus 35 strains of *B. anthracis* were isolated (among them 17 from humans, others from beef, cattle skin, animal hair and soil). Isolated strains are of high virulence.

24 *B. anthracis*-strains were tested in this study. Isolates were collected from different sources during 1989-2001 and identified by the NCDC Anthrax Laboratory. AP-PCR identified relationship among the tested isolates. The genetic profiles for 23 *B. anthracis*-strains were identical to each other. One strain (No. 2) isolated in 1989 from the burial site has a different genetic profile (Fig. 3).

Fig. 3: AP-PCR, *B. anthracis*-strains



References:

1. „Diagnostics of particularly Dangerous and Less Known Infections (Methods of Laboratory investigation).“ Rostov University Press, (1970) 193-214.
2. Turnbull P.C.B.: „Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals, WHO Department of Communicable Diseases Surveillance and response.“ (1998).

Corresponding author:

P. Imnadze, Ph.D., M.D., Director
National Center for Disease Control
9, Asatiani St., Tbilisi, 380077, Georgia

[zurück zum Inhalt](#)

Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Tularämie

E. Hofer

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling
(Direktor: A. Univ.-Prof. Dr. W. Schuller)

- **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Key-words**
 - **Summary**
 - **Einleitung**
 - **Ätiologie**
 - **Epidemiologie**
 - **Klinik**
 - **Mikrobiologische Diagnostik**
 - **Literatur**
-

Schlüsselwörter:

Tularämie, *Francisella tularensis*, Labordiagnostik, Naturherd, Zoonose, Epidemiologie, Österreich

Zusammenfassung

Das epidemische Auftreten der Tularämie seit 1994 im nordöstlichen Teil Österreichs, einem seit langem bekannten Naturherd, wird beschrieben. Von 1994 bis 2001 konnte bei 167 Feldhasen (*Lepus europaeus*) *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Biovar II Ery r direkt-kulturell nachgewiesen werden.

Epidemiologie, Klinik und Labordiagnostik der Tularämie werden besprochen.

Key-words:

Tularemia, *Francisella tularensis*, laboratory-diagnosis, natural focus, zoonosis, epidemiology, Austria

Summary

The epidemic occurrence of tularemia since 1994 in the north-eastern part of Austria, a well-known natural focus, is described. From 1994 to 2001 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Biovar II Ery r was detected in 167 European brown hares (*Lepus europaeus*) by means of direct culture.

Epidemiology, clinical picture and laboratory-diagnosis of tularemia are discussed.

Einleitung

Die Tularämie (Hasenpest, Nagerpest, Lemmingfieber, Hirschfliegenfieber, Ohara-Krankheit) ist eine auf der ganzen nördlichen Hemisphäre vorkommende, auf den Menschen übertragbare, bakterielle Naturherdinfektion, die durch *Francisella (F.) tularensis* verursacht wird.

Schon im 17. Jahrhundert wurden in Norwegen bestimmte Krankheiten beim Menschen mit den Lemmingen (*Lemmus lemmus*) in Verbindung gebracht. 1896 wies Horne bei der mikroskopischen Untersuchung von Lemmingkadavern

sehr kleine, punktförmige, schwierig zu züchtende Lemmingpestbakterien nach [1]. 1912 gelang es McCoy und Chapin, bei Erdhörnchen (*Citellus beecheyi*) im County Tulare in Kalifornien den Erreger einer pestähnlichen Krankheit zu züchten, den sie *Bacterium tularensis* nannten. Francis, der den Erreger intensiv untersuchte, bezeichnete die Krankheit als Tularämie [2].

Der erste Tularämiefall in Österreich wurde von Pillat und David im Oktober 1935 bei einem Mann klinisch, bakteriologisch und serologisch festgestellt, der im Marchfeld in Niederösterreich einen krank aufgefundenen Feldhasen abgehäutet hatte und 3 Tage später erkrankt war [3].

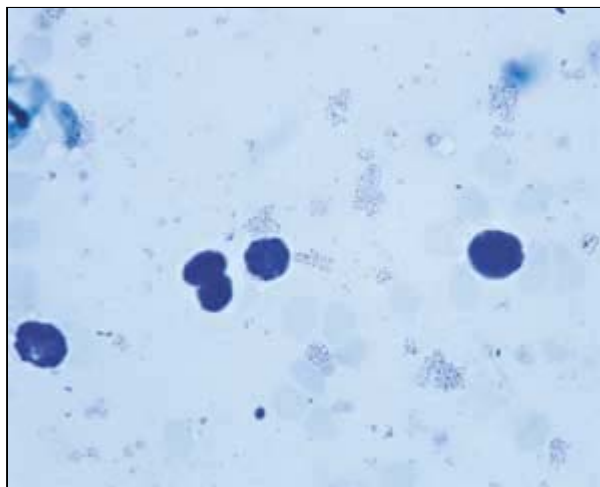
Im Herbst und Winter 1959/60 wurden bei den Beschäftigten einer Zuckerfabrik in Niederösterreich 577 Erkrankungen als Tularämie verifiziert. Nach einer Massenvermehrung bei Mäusen kam es bei der Rübenwäsche zur Bildung eines hoch infektiösen Aerosols [4].

In den letzten drei Jahrzehnten wurden in Österreich durchschnittlich 10 Tularämiefälle pro Jahr amtlich gemeldet, wobei zuletzt in den Jahren 1994-1998 gehäuft Erkrankungen bei Menschen gleichzeitig mit 2 Feldhasenepizootien aufgetreten sind [5, 6]. Nachfolgend soll über die wichtigsten Merkmale der Tularämie, die Verbreitung dieser Naturherdinfektion in Österreich sowie über labordiagnostische Möglichkeiten informiert werden.

Ätiologie

F. tularensis, eine von zwei Species der einzigen Gattung *Francisella* der Familie *Francisellaceae*, ist ein mit 0,2-0,7 µm x 0,2 µm sehr kleines, pleomorphes, oft kokkoides (Abb. 1), unbewegliches, gramnegatives, strikt aerob wachsendes, fakultativ intrazelluläres Bakterium mit einem sehr weit gefächerten Infektionsspektrum. Die Species *F. tularensis* umfasst die vier Subspecies (*ssp.*) *tularensis*, *holarctica*, *mediaasiatica* und *novicida*, wobei vor allem die ersten drei klinisch von Bedeutung sind [7, 8, 9]. Bei der *ssp. holarctica* (früher *palaeartica* oder Typ B) lassen sich 3 Biovarien unterscheiden (Tab. 2), *Biovar I Ery s* (Erythromycin sensibel), *Biovar II Ery r* (Erythromycin resistent) und *Biovar japonica* [10].

Abbildung 1: *F. tularensis* kokkoid geformt und nestförmig gelagert im Organausstrich eines akut-septikämisch verendeten Feldhasen; Giemsa-Färbung (Ölimmersion ca. 1.000 x)



Die *ssp. holarctica*, die in Europa, Nordamerika und Japan vorkommt, und die *ssp. mediaasiatica*, die in Zentralasien vorkommt, verursachen beim Menschen meist weniger

schwere, lokalisierte Erkrankungen, während bei einer Infektion durch die in Nordamerika vorkommende für Menschen hochvirulente *ssp. tularensis* (früher Typ A) auch lebensbedrohende, generalisierte Krankheitsformen möglich sind.

Wie man seit kurzem weiß, tritt die in Nordamerika vorkommende hochvirulente *ssp. tularensis* auch in Europa auf [7]. Von 1986 bis 1988 wurden in der Donauregion nahe Bratislava in der Slowakei 17 Stämme bei auf Kleinnagern parasitierenden Flöhen und Milben isoliert, die biochemisch und biologisch nicht von *ssp. tularensis* zu unterscheiden waren [11].

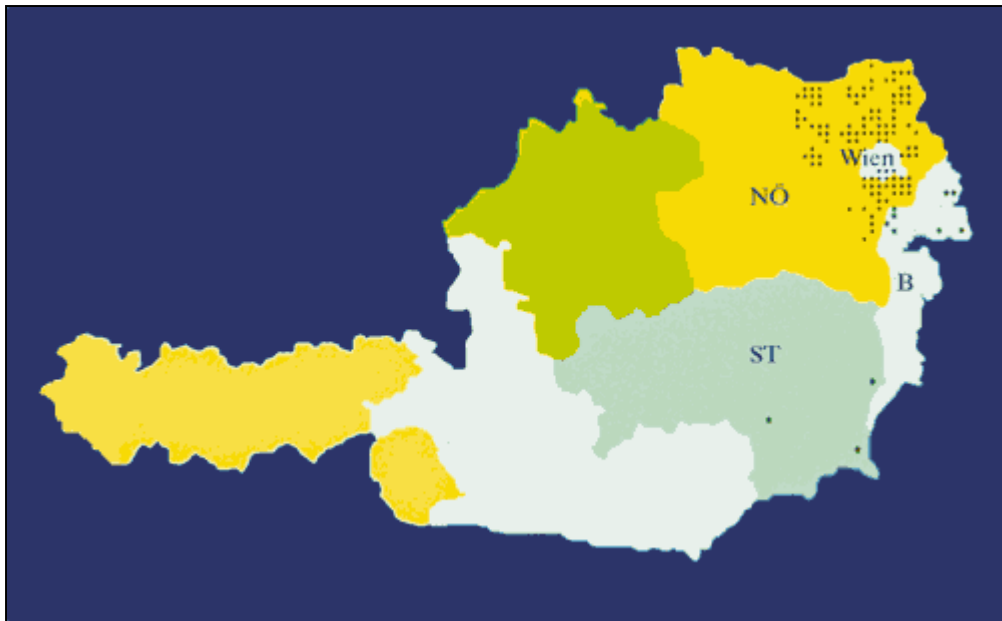
Auch ein Stamm, der 1990 bei einer aus der Umgebung von Graz stammenden *Ixodes ricinus*-Zecke in der Slowakei gezüchtet werden konnte, zeigte die Eigenschaften der für Menschen und Kaninchen hochvirulenten *ssp. tularensis* [12].

Auf welche Weise die *ssp. tularensis* in die Slowakei und nach Österreich eingeschleppt wurde, ist nicht bekannt. Denkbar wäre eine Ausbreitung durch infizierte Nagetiere sowie durch Vögel und deren Ektoparasiten, aber auch eine Freisetzung des Erregers im Rahmen militärischer Forschungsprogramme [8].

Bei Menschen, Feldhasen und Nagetieren wurde die *ssp. tularensis* bisher in Österreich noch nicht nachgewiesen. Alle 167 seit 1994 in der Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen in Mödling bei Feldhasen isolierten und charakterisierten Stämme erwiesen sich, ebenso wie 4 untersuchte Isolate vom Menschen, als mäßig virulente *F. tularensis subsp. holarctica Biovar II Ery r* [5, 6].

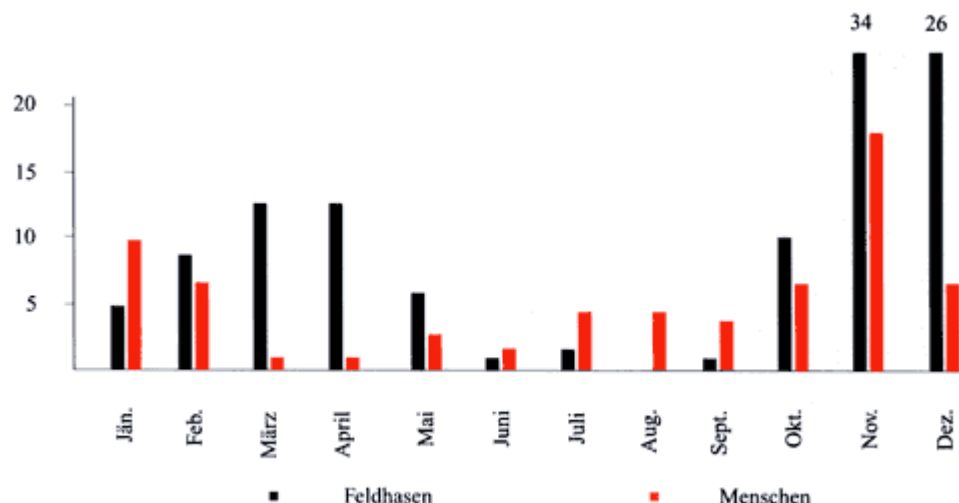
Epidemiologie

Im äußersten Nordosten Österreichs besteht ein aktiver Tularämie-Naturherd (Abb. 2), der mit den Endemiegebieten in der Slowakei und Tschechien entlang den Flüssen March und Thaya zusammenhängt. Bei einer Massenvermehrung von Feldmäusen (*Microtus arvalis*), die witterungsabhängig in mehrjährigen Zyklen auftritt, ist hier mit einem Seuchenausbruch und einer Häufung der Tularämiefälle beim Menschen zu rechnen [31]. Sporadische Tularämiefälle sind auch in anderen Gebieten als dem nordöstlichen Teil Österreichs möglich. So existiert im südlichen Burgenland und der angrenzenden Steiermark offensichtlich ein mit dem Seuchenherd im Nordosten nicht zusammenhängendes Endemiegebiet (Abb. 2), in dem die Tularämie mehrmals bei Feldhasen nachgewiesen wurde [16, 25]. Tularämiefälle beim Menschen werden vereinzelt auch in Oberösterreich gemeldet.



Während der ersten in Österreich nachgewiesenen Epidemie erkrankten von Ende November 1936 bis Anfang Jänner 1937 in den Bezirken Mistelbach und Gänserndorf in einem etwa 20 km breiten Geländestreifen westlich der March ungefähr 200 Menschen an Tularämie, wobei in der Mehrzahl Personen betroffen waren, die tot oder krank aufgefundene Feldhasen abgebalgt, zerlegt oder verzehrt hatten. Während und nach der zweiten Epidemie 1945/46 weitete sich die Seuche auf die Bezirke Korneuburg, Tulln, Melk, Krems, Gmünd, Zwettl, Horn, Waidhofen a. d. Thaya und auf Bezirke südlich der Donau aus. Die während des Hasensterbens im Herbst 1994 gemeldeten und überwiegend im Krankenhaus Mistelbach behandelten Fälle beim Menschen (Abb. 3) waren in der Mehrzahl auf einen Kontakt mit Feldhasen zurückzuführen [5].

Abbildung 3: Jahreszeitliche Gegenüberstellung der Zahl nachgewiesener Tularämiefälle beim Feldhasen und der amtlich gemeldeten Tularämiefälle beim Menschen, Oktober 1994-März 1998



1994/95 wurden Tularämiefälle bei Feldhasen und Menschen (Tab. 1) zunächst vorwiegend in den östlichen Bezirken Mistelbach und Gänserndorf nachgewiesen, 1997/98 waren auch Bezirke im Norden Niederösterreichs betroffen [5, 6].

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Zahl bei Feldhasen gezüchteter *F. tularensis*-Isolate und der Zahl amtlich

gemeldeter Tularämiefälle beim Menschen in Österreich, 1994-2001

Tularämiefälle	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Feldhase	20	18	5	33	37	27	16	11
Mensch	26	16	9	16	19	2	5	1*
*Die endgültige Zahl der gemeldeten Fälle ist derzeit noch nicht bekannt								

Wie bereits bei der ersten Epidemie konnte auch bei den letzten beiden Epidemien eine vorausgehende Mäuseplage beobachtet werden [17]. Vermutlich bricht die Seuche zuerst unter den Mäusen aus und wird dann auf Feldhasen übertragen [18, 19].

F. tularensis wurde in Österreich bisher bei Menschen, Feldhasen, Wildkaninchen, Mäusen, Zecken und in einer Wasserprobe nachgewiesen [4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23].

Als Reservoiertiere der Tularämie gelten Hasenartige und Nagetiere (*Lagomorpha* und *Rodentia*), aber auch Ektoparasiten, vor allem Zecken, spielen als Vektoren eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Naturherdes [14, 20, 22, 23].

Das Auftreten der Tularämie in der Nähe von Flüssen steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Fähigkeit der Francisellen, sich im Inneren von Amöben zu vermehren [21].

Klinik

Die klinische Form der Tularämie beim Menschen reicht von subklinischen Fällen, wie in Norwegen, wo unter gesunden Schulkindern eine Seroprävalenz von 4,7% festgestellt wurde, bis zur, in Europa seltenen, generalisierten Form, wo der Erreger aus dem Blut isoliert werden kann [21].

Das Krankheitsbild ist je nach Übertragungsweg und Eintrittsort des Erregers sehr vielfältig. Die äußere Tularämie tritt als kutano- (ulceroglanduläre, glanduläre), okulo- und oral- (pharyngeal-tonsillo-) glanduläre Form, die innere Tularämie als thorakale (pulmonale) oder abdominale Form auf [8, 24].

Die häufige kutano- und die seltenere okuloglanduläre Form entstehen durch Kontakt- und Schmierinfektion oder Spritzer erregerrhaltiger Flüssigkeiten vor allem beim Zerlegen von Feldhasen, die kutanoglanduläre Form auch durch Zeckenbisse oder Insektenstiche. Die thorakale oder oralglanduläre Form entwickelt sich nach aerogener Staub- oder Tröpfcheninfektion beim Abhäuten oder Zerlegen von infizierten Feldhasen und bei Arbeiten mit landwirtschaftlichen Produkten wie Heu, Stroh, Getreide oder Zuckerrüben, wenn diese mit Exkreten oder Kadavern von Mäusen kontaminiert sind. Abdominale oder oralglanduläre Formen treten nach oraler Infektion durch kontaminierte Lebensmittel oder erregerrhaltiges Wasser auf.

Die jahreszeitliche Analyse der Tularämiefälle des Menschen zeigt einen charakteristischen Anstieg der Erkrankungen während und nach der Hasenjagdsaison im Spätherbst und Winter (Abb. 3).

Eine Verschiebung des typischen saisonalen Auftretens in der kalten Jahreszeit hin zum Sommer durch den Anstieg der Übertragungen infolge von Zeckenbissen oder Insektenstichen wurde in der Slowakei beobachtet.

Während bei einer Infektion durch Feldhasen meist die ulceroglanduläre oder glanduläre Form mit Entzündung der Lymphknoten an den oberen Extremitäten beobachtet wird, liegt die Eintrittsstelle der Erreger bei einer Übertragung durch Arthropoden eher im Bereich der unteren Extremitäten [20]. Entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist eine möglichst frühzeitige Antibiotikatherapie mit Ciprofloxacin, Tetrazyklinen oder

Aminoglykosiden [8, 20, 24, 27, 28, 29]. Eine Vakzine gegen die Tularämie ist in Österreich nicht zugelassen [30].

Mikrobiologische Diagnostik

In Gram- oder besser Giemsa-, und Immunfluoreszenz-gefärbten Organausstrichen septikämisch verendeter Feldhasen sind die *Francisellen* bei hoher Keimdichte und nestförmiger Lagerung mikroskopisch gut darstellbar [5]. Vereinzelt Erreger sind jedoch aufgrund ihrer geringen Größe und kokkoiden Form in gefärbten Ausstrichen mikroskopisch kaum zu erkennen.

Für den kulturellen Nachweis von *Francisella tularensis* wird das Probenmaterial, z.B. Punktate von Lymphknoten oder Ulkusabstriche, auf ein geeignetes, festes Nährmedium, z.B. auf Cystine Heart-Agar (Difco) mit 10% Schafblutzusatz, ausgestrichen [5, 26].

Die Bebrütung sollte mindestens 1 Woche lang bei 36-37°C, am besten bei hoher Luftfeuchtigkeit in einer Atmosphäre mit 5%igem CO₂-Gehalt erfolgen.

Bei hoher Keimzahl kann häufig bereits nach 2 Tagen Bebrütung ein konfluierendes, grau gefärbtes Wachstum auf Cystine Heart-Agar beobachtet werden. Bei geringen Keimzahlen oder chronischen Infektionen muss jedoch mit einer Bebrütungszeit von mindestens 3-5 Tagen gerechnet werden, bevor Kolonien sichtbar werden. Das Wachstum von *Francisella tularensis* auf festen Nährböden wird durch andere, schneller wachsende Bakterienarten häufig unterdrückt. Bei kontaminierten Proben ist daher ein selektiver Nährbodenzusatz von z.B. 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Polymyxin B zur Unterdrückung des Wachstums der Begleitmikroflora Voraussetzung für das Gelingen der Kultur [6]. Cystine Heart-Agar mit 10% Schafblutzusatz zeigt eine sehr charakteristische, dunkle Verfärbung des Agars in der Umgebung der Kolonien (Abb. 4), die sich bei längerer Bebrütung nach etwa 1 Woche zu einer vollständig hämolytischen Zone verstärkt. Darüber hinaus verändert sich die Farbe der Kolonien bei längerer Bebrütung von grau zu cremefarben.

Abbildung 4: *F. tularensis*-Direktkultur der Milz eines akut-septikämisch verendeten Feldhasen nach 4 Tagen aerober Bebrütung mit charakteristischer, dunkler Verfärbung des Agars im Koloniebereich



Die sichere Identifizierung des isolierten Erregers kann mittels spezifischem Antiserum im Objektträgerverfahren und Analyse der 16S rRNA-Gensequenz vorgenommen werden

[35].

Für die weitere Charakterisierung der Isolate ist eine Prüfung auf Verwertung von Glycerin und Glucose erforderlich, z.B. mittels Cystin Trypticase-Schrägagar (BBL-Nr. 11094) mit Zusatz von 5% Pferdeserum und 1% Glycerin bzw. 1% Glucose (Tab. 2). Zu diesem Zweck wird der Schrägagar massiv beimpft und mindestens 3 Tage aerob bei 36-37°C bebrütet. Im positiven Fall schlägt der Phenolrot-Indikator von rötlichorange nach gelb um.

Die Differenzierung der Biovare *I Ery s* und *II Ery r* der *subsp. holarctica* erfolgt mittels Agardiffusionstest. Nach Auflegen eines mit 15 µg Erythromycin beladenen Blättchens auf eine mit engen Ösenstrichen beimpfte Agarplatte und 2 Tagen aerober Bebrütung bei 36-37°C zeigt nur die Biovar *II Ery r* der *subsp. holarctica* keinen Hemmhof (Tab. 2).

Tabelle 2: Wichtige Kriterien zur Charakterisierung von *F. tularensis*-Isolaten

Subspecies	Biovare	Verwertung von Glycerin	Verwertung von Glucose	Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin
<i>tularensis</i>		+	+	+
<i>holarctica</i>	<i>I Ery s</i>	-	+	+
	<i>II Ery r</i>	-	+	-
	<i>japonica</i>	+	+	+
<i>mediaasiatica</i>		+	-	+

Als Alternative zur Erregerisolierung bei ulceroglandulärer Tularämie wurden viel versprechende Ansätze der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entwickelt [32, 33, 34]. Auch ein hoch sensitiver Capture-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und ein immunochromatographischer Schnelltest wurden erfolgreich aufgebaut [36]. In der klinischen Routine stützt sich die Diagnose vorwiegend auf den Nachweis von Serumantikörpern mittels Agglutinationstest. Bei einem Serumtiter von 1:160 nach mindestens 2 Wochen dauernder Erkrankung kann ein Verdacht auf Tularämie ausgesprochen werden, diagnostisch beweisend ist nur ein signifikanter Titeranstieg bei gepaarten Serumproben. Da dieser Test relativ unempfindlich ist, wurden sensitivere, hochspezifische Sandwich-ELISA als Screening-Tests mit Differenzierung von IgG-, IgM- und IgA-Isotypen und ein LPS-spezifischer Westernblot als Bestätigungstest entwickelt [8, 27].

Die Entwicklung einer zellulären Immunität kann durch spezifische Antigenstimulation peripherer Blutlymphozyten oder einen Hauttest nachgewiesen werden [26].

Literatur:

1. Horne H.: „Eine Lemmingpest und eine Meerschweinchenepizootie. Ein Beitrag zur Beleuchtung der Ursachen der Lemmingsterbe in den so genannten Lemmingjahren.“ Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Abt. Orig. Bd. 66 (1912) 169-193.
2. Bell J.F.: „Francisella.“ In: „Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.“ Bd. III. Blobel H., Schliesser T., Fischer, Stuttgart (1981) 172-256.
3. David H.: „Zum Auftreten der Tularämie in Österreich (Epidemiologie und Diagnose).“ Wien. Klin. Wochenschr. 50 (1937) 459-462.
4. Puntigam F.: „Thorakale Formen im Seuchengeschehen der Tularämie in Österreich.“ Wien. Klin.

Wochenschr. 72 (1960) 813-816.

5. Hofer E., Schildorfer H., Flatscher J., Müller M.: „Zum Nachweis der Tularämie bei Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Österreich.“ Wien. Tierärztl. Mschr. 81 (1997) 301-308.

6. Steineck Th., Hofer E.: „Zum Vorkommen der Tularämie in Österreich.“ Verh. ber. Erkr. Zootiere 39. Internationales Symposium Wien (1999) 263-269.

7. Johansson A., Ibrahim A., Göransson I., Eriksson U., Gurycova D., Clarridge III J.E., Sjöstedt A.: „Evaluation of PCR-Based Methods for Discrimination of *Francisella* Species and Subspecies and Development of a Specific PCR That Distinguishes the Two Major Subspecies of *Francisella tularensis*.“ J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 4180-4185.

8. Grunow R., Splettstößer W., Hirsch F.W., Kleemann D., Finke E.-J.: „Differentialdiagnose der Tularämie.“ Dtsch. Med. Wschr. 126 (2001) 408-413.

9. Forsman M., Sandström G., Sjöstedt A.: „Analysis of 16S Ribosomal DNA Sequences of *Francisella* Strains and Utilization for Determination of the Phylogeny of the Genus and for Identification of Strains by PCR.“ Int. J. Syst. Bacter. 44 (1994) 38-46.

10. Olsufiev N.G., Meshcheryakova I.S.: „Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912.“ Int. J. Syst. Bacter. 33 (1983) 872-874.

11. Gurycova D.: „First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe.“ Eur. J. Epidemiol. 14 (1998) 797-802.

12. Gurycova D.: „Characterisation and Classification of different strains of *Francisella tularensis* isolated in Central Europe.“ Second International Conference on Tularemia, Hradec Kralove, Czech Republic, Vojenske Zdravotnicke Listy – Supplementum, Rocnik LXVI, c. 1 (1997) 24.

13. Vyrostekova V., Khanakah G., Gurycova D., Kocianova E., Kmety E., Stanek G., Rehacek J.: „Dynamics of infection with *Francisella tularensis* and *Borellia burgdorferi* S.L. in reservoir animals and ticks – March River Basin, Austria, 1994/1995.“ Second International Conference on Tularemia, Hradec Kralove, Czech Republic, Vojenske Zdravotnicke Listy – Supplementum, Rocnik LXVI, c. 1 (1997) 3.

14. Hubalek Z., Sixl W., Halouzka J., Mikulaskova M.: „Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics.“ Cent. Eur. J. Public Health 5 (1997) 199-201.

15. Hayek H., Flamm H.: „Zum Problem der Reserviertiere der Tularämieerreger im Marchfeld.“ Wien. Med. Wschr. 32-34 (1967) 765-767.

16. David H.: „Untersuchungen über die Tularämie in Österreich (1935-1945).“ Wien. Tierärztl. Mschr. 10 (1947) 523-544.

17. Bsteh O.: „Fälle von Tularämie.“ Wien. Klin. Wochenschr. 50 (1937) 108.

18. Knothe H., Zimmermann O., Havemeister G.: „Über die Tularämie in Schleswig-Holstein. Ein epidemiologischer Bericht anlässlich des Wiederauftretens der Tularämie in Eiderstedt im Winter 1957/1958.“ Dtsch. Med. Wschr. 84 (1959) 906-909.

19. Michalka J.: „Die Tularämie in Österreich.“ Wien. Tierärztl. Mschr. 47 (1960) 341-348.

20. Gurycova D., Vyrostekova V.: „Epidemiology and clinical characteristics of tularemia.“ Antibiotika Monitor tom. XIV, 3/4 (1998) 61-66.

21. Berdal B.P., Mehl R., Meidell N.K., Lorentzen-Styr A.-M., Scheel O.: „Field investigations of tularemia in Norway.“ FEMS Immunol. Med. Microbio. 13 (1996) 191-195.

22. Hubalek Z., Sixl W., Halouzka J.: „*Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech

Republic and Austria.“ Wien. Klin. Wochenschr. 110/24 (1998) 909-910.

23. Gurycova D., Vyrostekova V., Khanakah G., Kocianova E., Kmety E., Stanek G.: „Importance of surveillance of tularemia natural foci in the known endemic area of Central Europe, 1991-1997.“ Wien. Klin. Wochenschr. 113/11-12 (2001) 433-438.

24. „Tularämie.“ In: „Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung.“ Dedie K., Bockemühl J., Kühn H., Volkmer K.-J., Weinke T., Enke Verlag, Stuttgart (1993) 363-376.

25. Deutz A., Hinterdorfer F.: „Untersuchungen zu Krankheiten des Feldhasen – Sektionsbefunde, Erregerspektrum, Zoonosen.“ Verh. ber. Erkr. Zootiere 39. Internationales Symposium Wien (1999) 445.

26. Gurycova D., Vyrostekova V.: „Microbiological diagnosis of tularemia.“ Antibiotika Monitor tom. XIV, 3/4 (1998) 67-72.

27. Hirsch F.W., Kleemann D., Grunow R.: „Fallbeispiele der Tularämie.“ Dtsch. Med. Wschr. 126 (2001) 393-394.

28. Johansson A., Berglund L., Gothefors L., Sjöstedt A., Tärnvik A.: „Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children.“ Pediatr. Infect. Dis. J. 19/5 (2000) 449-453.

29. Perez-Castrillon J.L., Bachiller-Luque P., Martin-Luquero M., Mena-Martin F.J., Herreros V.: „Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response.“ Clin. Infect. Dis. 33/4 (2001) 573-576.

30. Sandström G.: „The Tularemia Vaccine.“ J. Chem. Tech. Biotechnol. 59 (1994) 315-320.

31. Jusatz H.J.: „Dritter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa über den Zeitraum von 1950 bis 1960.“ Z. Hyg. Infekt.-Kr. 148 (1961) 69-93.

32. Sjöstedt A., Eriksson U., Berglund L., Tärnvik A.: „Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR.“ J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 1045-1048.

33. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., Göransson I., Wollin R., Forsman M., Tärnvik A., Sjöstedt A.: „Comparative Analysis of PCR versus Culture for Diagnosis of Ulceroglandular Tularemia.“ J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 22-26.

34. Karhukorpi E.K., Karhukorpi J.: „Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularemia with polymerase chain reaction.“ Scand. J. Infect. Dis. 33 (2001) 383-385.

35. Posthaus H., Welle M., Mörner T., Nicolet J., Kuhnert P.: „Tularemia in a common marmoset (Callithrix jacchus) diagnosed by 16S rRNA sequencing.“ Vet. Microbiol. 61 (1998) 145-150.

36. Grunow R., Splettstößer W., McDonald S., Otterbein C., O'Brien T., Morgan C., Aldrich J., Hofer E., Finke E.-J., Meyer H.: „Detection of Francisella tularensis in Biological Specimens Using a Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, an Immunochromatographic Handheld Assay, and a PCR.“ Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7 (2000) 86-90.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Erwin Hofer
Landesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen Ehrental
A-9020 Klagenfurt, Ehrentalerstraße 120
E-Mail: post.ehrental@ktn.gv.at

[zurück zum Inhalt](#)

Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren

D. Wilfingseder, H. Stoiber
Institut für Hygiene und Sozialmedizin und
Ludwig Boltzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck
(Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. M.P. Dierich)

- **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Key-words**
 - **Summary**
 - **Definition**
 - **Real-time PCR**
 - **Real-time PCR und interkalierende Farbstoffe**
 - **Spezifische Hybridisierungssonden**
 - **Ausblick**
 - **Literatur**
-

Schlüsselwörter:

PCR,quantitativereal-timePCR,SYBR®-Green I, TaqMan®-Prinzip, CT-Wert

Zusammenfassung

Die real-time quantitative PCR stellt eine moderne Technologie dar, die im molekularbiologischen Bereich sehr breite Verwendung findet. Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden können, wurde es durch Entwicklung der quantitativen real-time PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu machen. Dies macht die real-time quantitative PCR zu einem unentbehrlichen Werkzeug sowohl bei Sequenzanalysen, Genklonierungs- und Genexpressionsstudien, als auch im diagnostischen Bereich zum Nachweis von verschiedenen Pathogenen.

Key-words:

PCR,quantitativereal-timePCR,SYBR®-Green I, TaqMan®-principle, CT-value

Summary

Quantitative real-time PCR is a modern technology widely applied in the field of molecular biology. When compared to endpoint PCR, which allows only qualitative analyses of generated DNA-products, quantitative PCR allows highly accurate measurement of DNA-amounts and therefore quantitation of initial amounts of DNA. This feature makes real-time quantitative PCR a valuable tool in a variety of applications like sequence analyses, gene cloning and gene expression studies or determination of different pathogens.

Definition

Die real-time quantitative PCR oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der Mitte der achtziger Jahre von K.B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dar [1]. Die PCR ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *In-vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die Detektion kleinster DNA-Mengen. Die PCR ist ein sehr wichtiges Werkzeug der modernen Molekularbiologie geworden, da sie im Bereich der

Sequenzanalyse, bei Genexpressionsstudien und bei der Genklonierung eingesetzt wird [2, 3]. Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den so genannten Primern, liegt. Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Weiters sollten die Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen G/C-Gehalt zwischen 20-80%, sowie eine Schmelztemperatur (T_m) von ca. 60°C. Bei der Primerauswahl sollten Poly(T)-Bereiche, Haarnadelstrukturen und auch

3'-Komplementarität vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen oder Primerdimerbildung kommen könnte. Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert das Enzym DNA-Polymerase die *In-vitro*-DNA-Synthese. Die DNA-Synthese erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt bei 95°C, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, 2) einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden, und 3) einem Syntheseschritt, währenddessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonucleotide selektiv synthetisiert wird. Während jedes PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte verdoppeln, die im nächsten Zyklus wiederum als Template für die Amplifikationsreaktion dient. Theoretisch würde somit die Menge der Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen. In der Praxis wird jedoch eine ca. 70-80%ige Effizienz der PCR erreicht, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind. Eine typische PCR-Reaktion verläuft in den ersten Zyklen, bei denen die Templatemenge noch sehr gering ist, linear, steigt anschließend exponentiell an und erreicht in der letzten Phase der Reaktion ein Plateau, da die Enzymaktivität nach einer bestimmten Zeit nachlässt und auch die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Oligonucleotid-Primern, sondern untereinander hybridisieren. Aufgrund dieser PCR-Reaktionskinetik ist es schwierig, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu treffen. In vielen Fällen ist jedoch eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge nötig, z.B. bei Virusquantifizierung oder Überprüfung von antibakteriellen/antiviralen Therapieversuchen. Dies führte zur Entwicklung von der Endpunktmessung zur real-time quantitative PCR. Erste Erfolge, die Ausgangsmenge zu quantifizieren, wurden 1990 durch die quantitative kompetitive PCR erzielt [4]. Bei dieser Methode werden zwei Templates gleichzeitig in einer Reaktion eingesetzt, wobei es sich bei einem Template um einen internen Standard bekannter Kopienzahl und beinahe identischer Nucleotidsequenz handelt. Nach Gelanalyse können die beiden PCR-Produkte mittels Densitometer oder Szintillationszählung der eingebauten, radioaktiv markierten Nucleotidmengen verglichen und so die DNA-Menge der unbekannt Probe bestimmt werden.

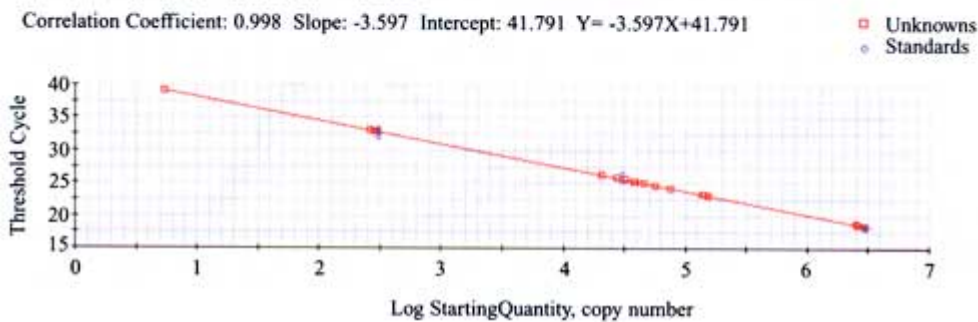
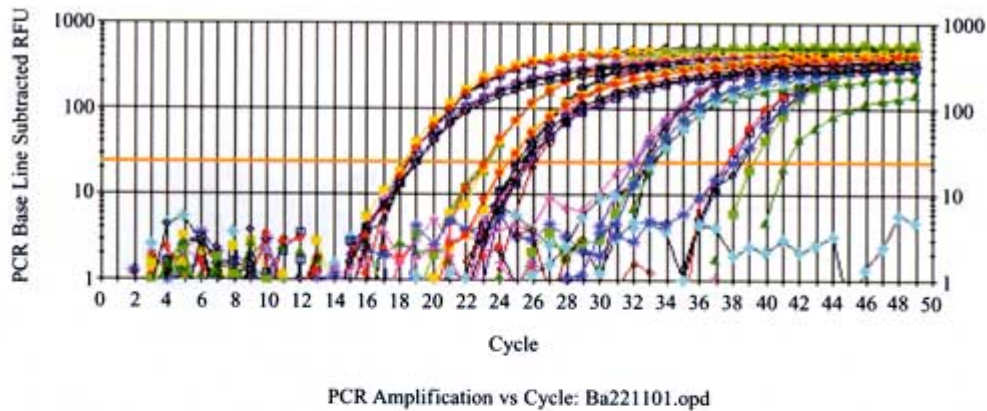
Real-time PCR

Die Grundlage für die heute angewandte real-time quantitative PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen [5]. Higuchi et al. statteten die PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und CCD-Kamera aus und fügten der PCR-Reaktion Ethidiumbromid (EtBr) zu. EtBr fluoresziert, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und durch UV-Licht angeregt wird. So konnte die Fluoreszenz gemessen und die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden [6]. Die Methode wird auch heute noch angewandt, jedoch unter Verwendung anderer Farbstoffe. Bei der real-time PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Dieser Reporter kann von nicht-spezifischer Natur sein oder spezifisch mit der Ziel-DNA interagieren. In beiden Fällen

steigt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an. Real-time Detektionssysteme bestehen im Prinzip aus einem PCR-Cycler sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen werden. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels der geeigneten Computersoftware. Die Fluorophore werden – je nach System – mit Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt.

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nucleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, gibt. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf bekannte Templatemengen amplifiziert, sodass man vergleichen kann, welche Templatemenge man bei welchem C_T -Wert erhält. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann. Ein typischer real-time PCR-Run und die daraus resultierende Standardkurve ist in Abb. 1 dargestellt.

Abbildung 1: Datenanalyse und Standardkurve: Die Quantifizierung unbekannter DNA-Ausgangsmengen beruht auf ermittelten C_T -Werten von Standards bekannter Konzentrationen. In diesem Beispiel wurden bekannte und unbekannte Konzentrationen von *Bacillus anthracis* mittels real-time quantitative PCR amplifiziert und anschließend mithilfe der daraus resultierenden Standardkurve quantifiziert. Der Schwellenwert, bei dem die Reporterfluoreszenz die Basisfluoreszenz deutlich übersteigt, (Y-Achse) wird gegen den log der Ausgangs-DNA-Menge (X-Achse) aufgetragen.



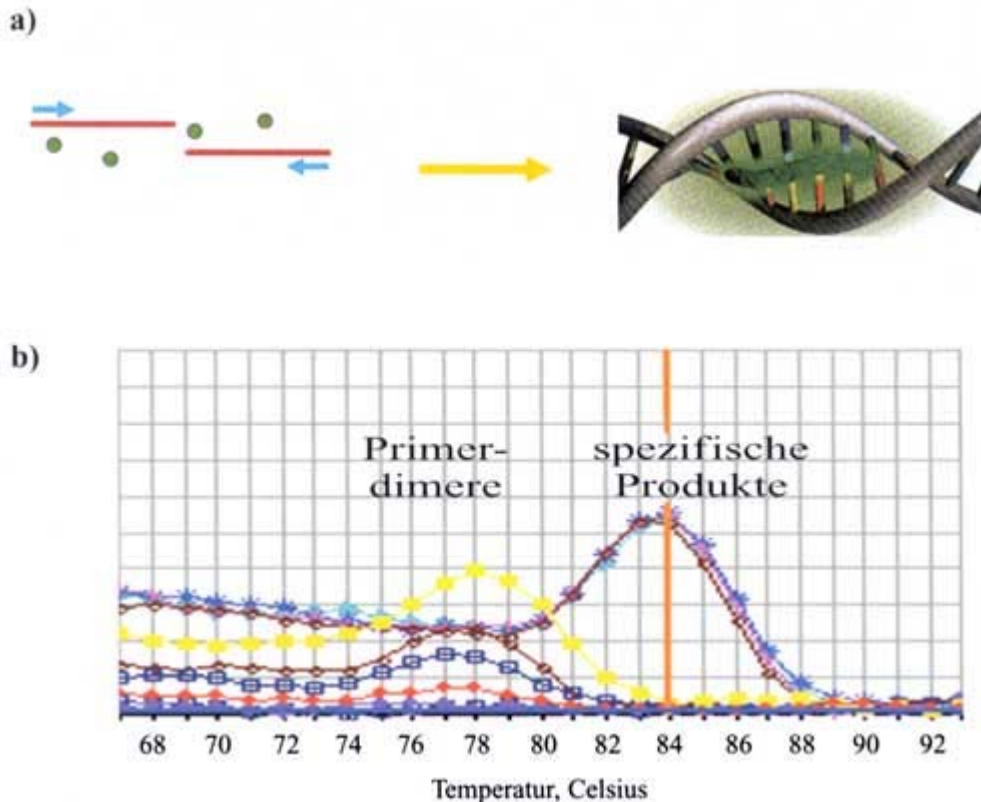
Real-time PCR und interkalierende Farbstoffe

Wie bereits erwähnt, verwendet man heutzutage andere interkalierende Farbstoffe als EtBr, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern, hier vor allem SYBR®-Green I (Molecular Probes, Portland, Oregon). Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich – wie EtBr – unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein (Abb. 2a). Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Der Vorteil von SYBR®-Green I ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch eingebaut wird und in jede beliebige PCR-Reaktion eingesetzt werden kann, sowie die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sodass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion auch einen Fluoreszenzanstieg verursachen können, nicht möglich ist. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren beziehungsweise auch Mutationsanalysen sind im Anschluss an den PCR-Run mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren oder Mutationen unterscheiden, da Primerdimere/Mutationen bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte (Abb. 2b).

Abbildung 2: SYBR®-Green I (SG I)-Reaktion und Schmelzkurvenanalyse:

a) Nach Einbau in doppelsträngige DNA fluoresziert SG I, es kommt zu einem Fluoreszenzanstieg, der direkt proportional zur Produktmenge ist.

b) Die Unterscheidung der mit SG I markierten PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt im Anschluss an die PCR-Reaktion. Kleinere Fragmente (Primerdimere, Mutationen) haben eine niedrigere T_m als spezifische PCR-Produkte.



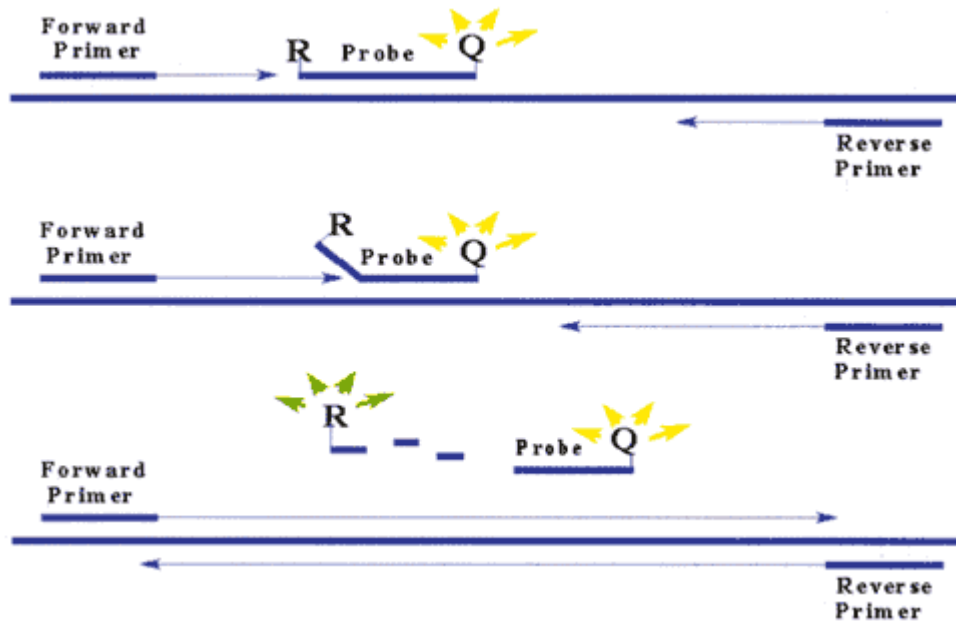
Spezifische Hybridisierungssonden

Das Problem der mangelnden Spezifität bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen konnte durch Design von spezifischen Hybridisierungssonden gelöst werden.

TaqMan-Sonden

Beim TaqMan- oder auch 5'-Nuclease-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, die so genannte TaqMan-Probe. TaqMan-Proben sind Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan-Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5', 3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann (Abb. 3).

Abbildung 3: TaqMan-Prinzip: Erst nach Abspaltung des Reporters (R) vom Quencher (Q) durch die 5', 3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Reporterfluoreszenz messbar und zeigt die Synthese des spezifischen Zielstranges an.



Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der Menge des DNA-Templates im Tube. Die Taq-Polymerase fragmentiert nur an die Zielsequenz gebundene TaqMan-Sonden, nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Häufig wird Fluorescein (FAM) als Reporter und Rhodamin (TAMRA) als Quencher verwendet, für eine real-time quantitative Multiplex-PCR, bei der mehrere Zielsequenzen in einer einzelnen PCR- Reaktion nachgewiesen werden, können Farbstoffe mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen als Reporter für die nachzuweisenden Sequenzen hinzugenommen werden (Tab. 1). Anstelle von TAMRA kann auch ein „Dark Quencher“ (Dabcyl, Methylorange) genommen werden, der den Wellenlängenbereich um 585 nm für weitere Reporterfarbstoffe freigibt. Ein Dark Quencher kann im Vergleich zu TAMRA die Lichtemission des Reporterfluorophors noch besser unterdrücken, interferiert auch nicht mit der Messung und wird vor allem für die Multiplex-PCR wie auch die Markierung von Molecular Beacons eingesetzt.

Tabelle 1: Fluorophore und ihre Extinktions- und Emissionswellenlängen

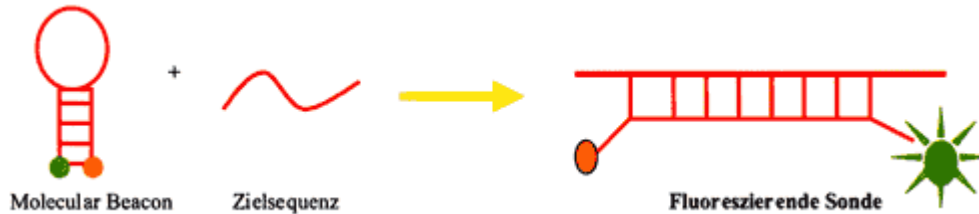
Fluorophor	Extinktion	Emission
Fluorescein (FAM), SYBR® Green	490 nm	530 nm
Hex, TET, VIC, JOE, Cy3	530 nm	575 nm
Tamra/Cy3	545 nm	585 nm
Texas Red, ROX	575 nm	620 nm
Cy5, LC640	635 nm	680 nm

Molecular Beacons

Molecular Beacons stellen eine Weiterentwicklung der TaqMan-Sonden dar. Die Beacons sind ebenfalls spezifische Hybridisierungs sonden, die eine Haarnadelstruktur mit eigenkomplementären Enden aufweisen, sodass Reporterfarbstoff und Quencher direkt benachbart zu liegen kommen. TaqMan-Proben bilden unter Umständen ungünstige Strukturen, sodass der Abstand zwischen Reporter und Quencher zu groß wird und damit die Fluoreszenzemission nicht mehr vollständig unterdrückt werden kann. Dieses Problem konnte durch die Entwicklung der Molecular Beacons gelöst werden. Die Haarnadelstruktur der Beacons ist so lange stabil, bis die Probe an der spezifischen Zielsequenz hybridisiert, was zu einer Konformationsänderung und damit auch

Freisetzung der Reporterfluoreszenz führt (Abb. 4). Die emittierte Reporterfluoreszenz wird wiederum mittels des optischen Systems des real-time PCR-Gerätes nach jedem Zyklus detektiert.

Abbildung 4: Molecular Beacons: Bei Hybridisierung der Sonde wird die Haarnadelstruktur aufgelöst, die Reporterfluoreszenz wird dadurch messbar.



MGB-Proben® (Applied Biosystems)

TaqMan®-minor-groove-binder (MGB)-Proben haben einen nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende, sodass das real-time Detektionssystem den emittierenden Reporterfarbstoff präziser messen kann. Weiters ist am 3'-Ende ein minor groove binder lokalisiert, der eine Erhöhung der T_m der Proben verursacht, weshalb es möglich wird, kürzere Proben zu designen. Eine kürzere Sonde ist von Vorteil, wenn man z.B. Alleldiskriminierung oder SNP-Assays durchführen möchte.

Ausblick

Die real-time quantitative PCR stellt ein relativ neues, grundlegendes Werkzeug der modernen Molekularbiologie dar und erlaubt Sequenz- und Mutationsanalysen, Genexpressions- und Genklonierungsstudien, Überprüfung des Virustiters unter Therapie sowie den diagnostischen Nachweis von Bakterien und Viren in kürzester Zeit und mit höchster Reproduzierbarkeit. Bei der real-time quantitativen PCR handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die Messungen über einen Bereich von 7 bis 8 log-Stufen und den Nachweis von kleinsten DNA-Kopienmengen zulässt. Im Bereich der real-time quantitativen PCR findet eine rasante Entwicklung statt, und Berichte, Publikationen oder Protokolle über die Einsatzmöglichkeiten der real-time quantitativen PCR häufen sich täglich. Zurzeit bieten sechs verschiedene Hersteller (ABI PRISM®-5700SDS, 7700SDS, 7900HT-SDS und 7000SDS von PE-Applied Biosystems, Light Cycler® von Roche-Diagnostics, iCycler® von BioRad, Mx4000® von Stratagene, Smart Cycler® System von Cepheid, Rotorgene® von Corbett Research) real-time PCR-Geräte an, es werden jedoch sicher weitere folgen. Die Geräte unterscheiden sich unter anderem bezüglich ihrer Bauweise, der Lichtquellen, mit denen die Fluorophore angeregt werden, und der Durchsatzraten. Von den meisten Herstellern der real-time quantitativen PCR-Geräte werden auch dazugehörige Kits und Reagenzien und allgemeine Richtlinien für die Reaktionsbedingungen angeboten, es ist bei einigen Geräten aber auch möglich, so genannte in-house Mixes zu verwenden. Natürlich kann mit den real-time PCR-Geräten auch Reverse Transcription-PCR (real-time quantitative RT-PCR) durchgeführt werden, wenn vor der PCR ein reverser Transkriptionsschritt programmiert wird. Zwei Beispiele für ein typisches real-time quantitative RT-PCR-Protokoll und Thermoprotokoll sind in Tabelle 2 dargestellt (AB-Kit, Stratagene-Kit). Somit stellt die real-time quantitative PCR eine relativ einfache Methode, mit der man schnell sehr präzise Ergebnisse erzielen kann, dar.

Tabelle 2: Beispiele für SYBR®Green- (AppBiosystems) und TaqMan®-Protokolle (Stratagene)

Reagenzien	Konzentration/50 µl Reaktion	
cDNA	x	
2 x SybrGreen Mastermix	1 x	
Primer I 10 µM/ml	200 nM	
Primer II 10 µM/ml	200 nM	
Fluorogenic Calibration Dye 1 µM/µl	10 nM	
A.D.	y-x	

Thermoprofil SYBR® Green-PCR (AB):		
Schritt 1	95°C	10 min
50 Zyklen	95°C	15 sec
	60°C	1 min
Schritt 2	Schmelzkurve!	

Reagenzien	Konzentration/50 µl Reaktion	
RNA	x	
10x Core RT-PCR buffer	1 x	
20 mM dNTP mix	0,8 mM	
50 mM MgCl ₂	5 mM	
Primer I 10 µM/ml	200 nM	
Primer II 10 µM/ml	200 nM	
Fluorogenic Probe 10 µM/ml	125 nM	
StrataScript RT 20 u/µl	1,25 U	
Sure Start™Taq DNA-Polymerase 5 U/µl; 500 U	2,5 U	
A.D.	y-x	

Thermoprofil TaqMan® RT-PCR (Stratagene):		
Schritt 1	45°C	30 min
Schritt 2	95°C	10 min
50 Zyklen	95°C	15 sec
	60°C	1 min
Schritt 3	hold 4°C	

Literatur:

1. Mullis K.B., Faloona F.A.: „Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.“ Methods Enzymol. 155 (1987) 335-50.
2. Scharf S.J., Horn G.T., Erlich H.A.: „Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences.“ Science 233 (1986) 1076-8.
3. Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.: „Recent advances in the polymerase chain reaction.“ Science 252 (1991) 1643-51.

4. Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H.F.: „Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2725-9.
5. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: „Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.“ Biotechnology (N Y) 10 (1992) 413-7.
6. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: „Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.“ Biotechnology (N Y) 11 (1993) 1026-30.

Anschrift des Verfassers:

A. Univ.-Prof. Dr. Heribert Stoiber
Institut für Hygiene und Sozialmedizin der Universität Innsbruck
A-6020 Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3
E-Mail: heribert.stoiber@uibk.ac.at

[zurück zum Inhalt](#)

Bacillus anthracis: Speciesbestimmung und Subtypisierung mittels automatischer Ribotypisierung

K. Grif 1, F. Allerberger 1, M.P. Dierich 1, A. Wimmer 2, H. Plicka 2

1 Institut für Hygiene und Sozialmedizin, Innsbruck

(Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. M.P. Dierich)

2 Amt für Wehrtechnik, Wien

(Leiter: Bgdr. R.F. Hofer)

- **Schlüsselwörter**
 - **Zusammenfassung**
 - **Key-words**
 - **Summary**
 - **Einleitung**
 - **Materialien und Methoden**
 - **Ergebnisse**
 - **Diskussion**
 - **Literatur**
-

Schlüsselwörter:

Bacillus anthracis, Ribotypisierung, RiboPrinter®

Zusammenfassung

Fünf *Bacillus anthracis*-Isolate wurden mittels RiboPrinter® unter Verwendung von *EcoRI*, *PvuII* und *Asel* als Restriktionsenzyme ribotypisiert. Es handelte sich um drei Wildtypisolate von Anthrax-Fällen bei Rindern aus Tirol, um den Impfstamm Sterne 34F2 und ein im Dezember 2001 aus einem Postsack amerikanischer Diplomatenpost gewonnenes Isolat („Bundesheer-Stamm“). Als Kontrollstämme wurden *Bacillus cereus* DSM 345 und ein *Bacillus megaterium*-Blutkultur-Isolat verwendet. Mittels automatisierter Ribotypisierung unter Verwendung von *EcoRI* ist es möglich, nicht hämolysierende apathogene Bazillen von der *B. anthracis/B.cereus*-Gruppe zu differenzieren. Die Restriktionsenzyme *Asel* und *PvuII* erlauben zudem eine Subtypisierung verschiedener *B. anthracis*-Isolate. Die Bandenmuster der 3 Tiroler Wildtypisolate waren bei Verwendung von *Asel* und *PvuII* voneinander nicht unterscheidbar, jedoch im Bandenmuster klar different vom Sterne-34F2-Stamm und dem „Bundesheer-Stamm“. Das *Asel*-Bandenmuster der beiden letztgenannten Isolate differiert von dem für den Ames-Stamm publizierten Restriktionsmuster, was den „Bundesheer-Stamm“ von dem in den Vereinigten Staaten im Rahmen von Bioterrorismus eingesetzten Ames-Stamm abtrennt. Das Vorkommen von einzelnen Sporen von *Bacillus anthracis* als natürliche Kontamination ist in Geweben aus natürlichen Ursprungsmaterialien nicht ungewöhnlich.

Key-words:

Bacillus anthracis, ribotyping, RiboPrinter®

Summary

Using a RiboPrinter® with *EcoRI*, *PvuII* and *Asel* as restriction enzymes, five *Bacillus anthracis*-isolates were ribotyped. These are three wild type isolates from anthrax cases in cattle in the Tyrol, the vaccination strain Sterne 34F2 and an „Austrian army strain“ isolated from an American diplomatic postal bag in December 2001 in Vienna (Austria). *Bacillus cereus* DSM 345 and a *Bacillus megaterium* blood culture isolate were used as control strains. With automated ribotyping using *EcoRI*, it is possible to differentiate non-

hemolytic apathogenic bacillae from the *B. anthracis*/*B. cereus*-group. In addition the restriction enzymes *Asel* and *PvuII* permit subtyping of different anthrax isolates. The band patterns of the three Tyrolean wild type isolates were indistinguishable from each other using *Asel* and *PvuII* but were, however, clearly different from the pattern of Sterne 34F2 and of the „Austrian army strain“. The *Asel* band patterns of both latter isolates differed from RiboPrinter® restriction patterns published for the Ames strain. This demonstrates that the „Austrian army strain“ is not identical to the Ames strain, allegedly used for bioterrorism in the United States during autumn 2001. It is not unusual for single spores of *Bacillus anthracis* to exist as natural contaminants in material fabrics of natural origins.

Einleitung

Wenngleich man über die tatsächliche Relevanz des Bedrohungspotentials Bioterrorismus und biologische Kriegsführung unterschiedlicher Meinung sein kann, sollte das öffentliche Gesundheitswesen auf die Erfordernisse schwerer Infektionskrankheiten vorbereitet sein [1]. Am 4. Oktober 2001 wurde in Florida bei einem 63-jährigen Patienten Lungenmilzbrand festgestellt [2]. Da auch bei einem Arbeitskollegen und am Arbeitsplatz (America Media Incorporated, Boca Raton, Florida) des letztendlich Verstorbenen *Bacillus anthracis* nachgewiesen wurde, war von einem beabsichtigten Ausbringen von Sporen auszugehen. Am 12. Oktober 2001 wurde Hautmilzbrand bei einem Angestellten des Medienkonzerns ABS in New York festgestellt [3]. Wegen einer Hautläsion hatte er initial einen Infektiologen aufgesucht, welcher die Verdachtsdiagnose stellte. Die kulturelle Verifizierung der Diagnose wurde im Hinblick darauf, dass auch hier von einer absichtlichen Ausbringung von Milzbrandsporen auszugehen ist, behördlich bestätigt. Mit diesen Fällen wurde leider bewiesen, dass Bioterrorismus als mögliches Szenario grundsätzlich zu bedenken ist. Der Charakterisierung von *B. anthracis*-Isolaten zur Gewinnung von Rückschlüssen über die Herkunft der Bakterien kommt deshalb große Bedeutung zu. Wir beschreiben die Eignung von automatischer Ribotypisierung als Mittel zur Speciesidentifizierung und Subtypisierung bei *B. anthracis*.

Material und Methoden

Bakterienisolate

Fünf *Bacillus anthracis*-Isolate wurden getestet. Es handelte sich um drei Wildtypisolate von Anthrax-Fällen bei Rindern aus Tirol (*B. anthracis* 3520, 4675, 6782) [4], um den Impfstamm Sterne 34F2 (Onderstepoort Biological Products, Onderstepoort, Südafrika) und ein im Dezember 2001 aus einem Postsack amerikanischer Diplomatenpost gewonnenes Isolat („Bundesheer-Stamm“). Als Kontrollstämme wurden *Bacillus cereus* DSM 345 (= ATCC 11778) und ein an anderer Stelle näher beschriebener *Bacillus megaterium*-Stamm B13143 aus einer humanen Blutkultur verwendet [5].

Ribotypisierung

Automatische Ribotypisierung mittels RiboPrinter® (Qualicon, Wilmington, DE, USA) unter Verwendung von *EcoRI*, *PvuII* (Qualicon) und *Asel* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) als Restriktionsenzyme erfolgte wie früher beschrieben [6]. Beim RiboPrinter-System wird gewissermaßen das gesamte rRNA-Operon und die angrenzenden Bereiche des Genoms in die Analyse einbezogen. Probenstämme werden über 18 h bei 35°C aerob auf Müller-Hinton-Agar (Oxoid, Basingstoke, UK) angezüchtet. Eine definierte Menge Bakterienkultur wird von der Agarplatte in ein Probengefäß übertragen und mit Puffer überschichtet. Nach zehnmütiger Hitzeinaktivierung werden die Zellen enzymatisch aufgebrochen. Die Bakterien-DNA wird durch spezifische

Verdauungsenzyme geschnitten. Auf einem Gel werden die Fragmente nach Größe getrennt und direkt auf eine Membran überführt. Die rRNA-Gene werden mittels einer von 5,5 kb *E. coli* *rrnB* Operon-Sonde spezifisch detektiert. Auf der Basis von Chemolumineszenz entsteht ein Bandenmuster – das RiboPrint®-Pattern. Dieses Muster wird mittels eingebauter CCD-Kamera in digitalisierter Form festgehalten und vom Computer nach Normalisierung mit vorhandenen RiboPrint®-Patterns verglichen.

Ergebnisse

Abbildung 1 gibt die Ergebnisse der Ribotypisierung unter Verwendung von *EcoRI* als Restriktionsenzym wieder. Der automatische Vergleich der gewonnenen Banden-Muster mit Mustern in der Qualicon®-Datenbank erbrachte für das *B. megaterium*-Isolat B13143 eine korrekte Species-Diagnose. Die fünf *B. anthracis*-Isolate erbrachten ein einheitliches Bandenmuster, welches vom Gerät als *B. cereus*-Muster eingestuft wurde. *B. cereus* DSM 345 (= ATCC 11778) wurde vom Gerät als *Bacillus thuringiensis* verkannt.

Abbildung 1: Automatische Ribotypisierung unter Verwendung von *EcoRI* als Restriktionsenzym. *EcoRI*-Ribotypisierung ermöglicht, *B. megaterium* und andere apathogene nicht-hämolyisierende Bazillen von der *B. anthracis*/*B. cereus*-Gruppe zu differenzieren.

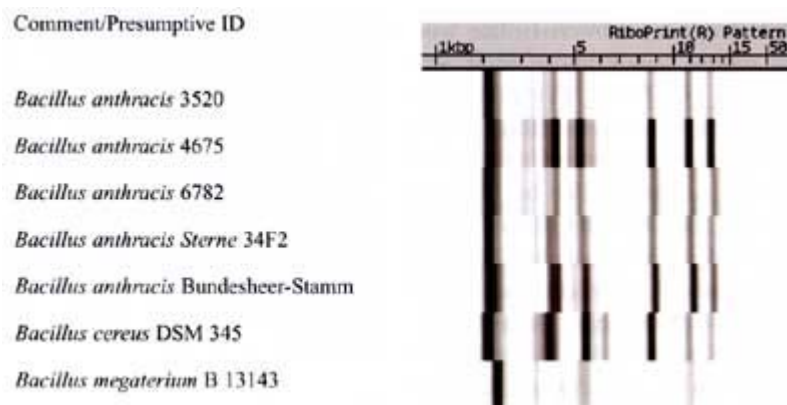


Abbildung 2 gibt die Ergebnisse der Ribotypisierung unter Verwendung von *Asel* als Restriktionsenzym wieder. Für das Genus *Bacillus* steht für dieses Restriktionsenzym derzeit keine Datenbank zur Verfügung. *B. cereus* DSM345 und *B. megaterium* B13143 erbrachten eigenständige, voneinander und von *Bacillus anthracis* zu unterscheidene Bandenmuster. Innerhalb der *B. anthracis*-Gruppe zeigten die drei Tiroler Isolate idente, charakteristische und von den zwei verbleibenden *B. anthracis*-Isolaten unterschiedliche Bandenmuster.

Abbildung 2: Automatische Ribotypisierung unter Verwendung von *Asel* als Restriktionsenzym. Die Bandenmuster der 3 Tiroler Wildstämme (3520, 4675, 6782) waren bei Verwendung von *Asel* voneinander nicht unterscheidbar, jedoch differieren von den Bandenmustern des Sterne-34F2-Stammes und dem im Dezember 2001 aus einem Postsack amerikanischer Diplomatenpost isolierten „Bundesheer-Stamm“. Das *Asel*-Bandenmuster der beiden letztgenannten Isolate unterscheidet sich zudem von dem für den Ames-Stamm publizierten Restriktionsmuster.

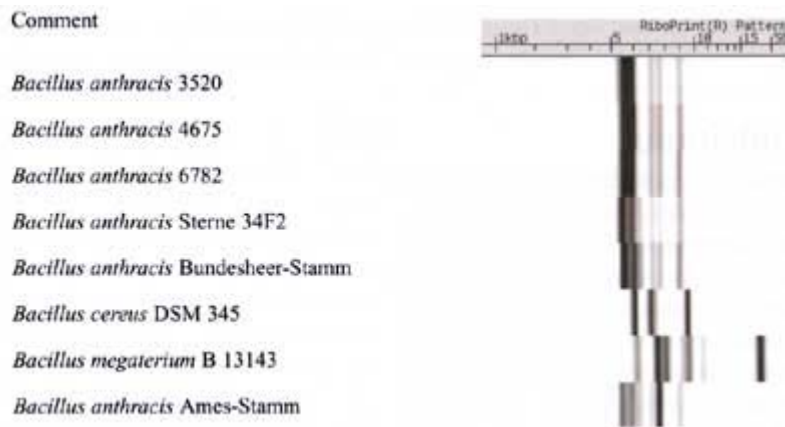
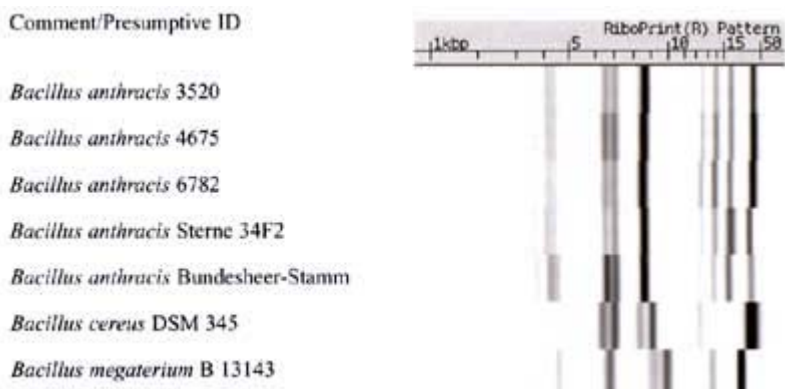


Abbildung 3 gibt die Ergebnisse der Ribotypisierung unter Verwendung von *PvuII* als Restriktionsenzym wieder. Für das Genus *Bacillus* steht für dieses Restriktionsenzym derzeit keine Datenbank zur Verfügung. *B. cereus* DSM345 und *B. megaterium* B13143 erbrachten eigenständige, voneinander und von *B. anthracis* zu unterscheidende Bandenmuster. Innerhalb der *B. anthracis*-Gruppe zeigten die drei Tiroler Isolate idente, charakteristische und von den zwei verbleibenden Anthrax-Isolaten unterschiedliche Bandenmuster.

Abbildung 3: Automatische Ribotypisierung unter Verwendung von *PvuII* als Restriktionsenzym. Die generierten Bandenmuster sind mit je 10 Banden komplexer als die Muster von *Asel*, was die Verwendung von *PvuII* für Subtypisierungen im Anschluss an Verwendung von *Asel* anbietet.



Diskussion

Bacillus anthracis ist eine genetisch sehr uniforme Bakterienspecies mit erstaunlich geringer Variabilität [7], was zwar molekulare Diagnostik erleichtert, eine Subtypisierung zur Gewinnung epidemiologischer Rückschlüsse jedoch erschwert. Phänotypisch lassen sich Isolate selbst unterschiedlichster geographischer Herkunft nicht differenzieren [8]. Die biochemischen und serologischen Methoden, die bei anderen Pathogenen zur Subtypisierung zum Einsatz kommen, haben, ebenso wie die Phagentypisierung, bei *B. anthracis* keinen Wert. Turnbull et al. postulierten, dass dieser exzeptionelle Species-Monomorphismus auf – im Vergleich zu allen anderen Species – relativ geringe Anzahl von Vermehrungszyklen zurückzuführen ist [8]. Vermehrungszyklen von *B. anthracis* hängen weitgehend von Tierinfektionen ab, wobei beträchtliche Zeitintervalle zwischen solchen Vorfällen liegen können. Da die Vermehrung praktisch ausschließlich im Tierkörper stattfindet, seien Vegetativformen von *B. anthracis* nur selten „Mutagenen, Phagen oder anderen Umwelteinflüssen, die Stammvariationen bewirken können“,

ausgesetzt [8].

Somit bleiben bei dieser monomorphen Spezies lediglich molekulargenetische Subtypisierungsverfahren, welche in den letzten Jahren zunehmend verfeinert wurden [9, 10, 11, 12, 13]. Molekulargenetische Typisierungsverfahren, die auf der Variabilität der Anzahl von „tandem repeats“ in der variablen Region des *vrrA*-Gens basieren, gelten derzeit als Goldstandard: Sie gestatten es, alle derart getesteten Stämme dieser genetisch monomorphen Bakterienart in fünf Kategorien einzuordnen und somit Hinweise auf die jeweilige Herkunft von *B. anthracis*-Isolaten zu geben [14, 15].

Mittels automatisierter Ribotypisierung unter Verwendung von *EcoRI* ist es möglich, nicht hämolysierende Bazillen von der *B. anthracis/B. cereus*-Gruppe zu differenzieren [5]. Die Restriktionsenzyme *Asel* und *PvuII* erlauben zudem eine Subtypisierung verschiedener Anthrax-Isolate. Die publizierten Sequenzen der 16S und 23S rRNA-Gene von *B. anthracis* und *B. cereus* enthalten keine „restriction sites“ für *Asel*. Die 4 bis 5 Banden, alle über 5 kbp (Abbildung 3) reflektieren somit die Platzierung der ribosomalen Operons im *Bacillus*-Chromosom. *Asel*-Ribotypisierung bietet sich somit für eine erste Subtypisierung von *B. anthracis* an. Auch für *PvuII* enthalten die publizierten Sequenzen der 16S und 23S rRNA-Gene von *B. anthracis* und *B. cereus* keine Restriktionsstellen. Zudem sind die generierten Bandenmuster mit 10 Banden komplexer als die Muster von *Asel*, was die Verwendung von *PvuII* im Anschluss an die Subtypisierung mit *Asel* anbietet. Die Bandenmuster der 3 Tiroler Wildstämme waren bei Verwendung von *Asel* und *PvuII* voneinander nicht unterscheidbar, jedoch klar different von den Bandenmustern des Sterne-34F2-Stammes und dem im Dezember 2001 aus einem Postsack amerikanischer Diplomatenpost isolierten „Bundesheer-Stamm“. Das *Asel*-Bandenmuster der beiden letztgenannten Isolate unterscheidet sich klar von den für den Ames-Stamm publizierten Restriktionsmustern [16, 17]. Dies würde den „Bundesheer-Stamm“ von dem in den Vereinigten Staaten im Rahmen von Bioterrorismus eingesetzten Ames-Stamm abtrennen. Das Vorkommen von einzelnen Sporen von *B. anthracis* als natürliche Kontamination ist in Geweben aus natürlichen Ursprungsmaterialien nicht ungewöhnlich [18].

Der Ausschluss der Species *B. anthracis* ist in der Veterinärmedizin und der Humanmedizin vor allem bei nicht-hämolysierenden *Bacillus*-Blutkulturisolaten erforderlich [19, 20]. Unsere Ergebnisse unterstreichen das beachtliche Potential von automatischer Ribotypisierung, welche im Bedarfsfall binnen weniger Stunden derartige Speciesbestimmungen ermöglicht. Zudem erlaubt die Ribotypisierung eine Subtypisierung von *B. anthracis* und somit epidemiologische Rückschlüsse über die Herkunft von Isolaten.

Literatur:

1. Allerberger F.: „Pest-Milzbrand-Tularämie.“ Antibiotika Monitor tom. XVII, 3/4 (1998) 4.
2. Bush L.M., Abrams B.H., Beall A., Johnson C.C.: „Index case of fatal inhalation anthrax due to Bioterrorism in the United States.“ N. Engl. J. Med. 345 (2001) 1607-1626.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: public health message regarding anthrax. 12 October 2001 (<http://www.bt.cdc.gov/DocumentApp/Anthrax/10122001Message>)
4. Khaschabi D., Schönbauer M.: „Mikrobiologische Diagnostik von Milzbrand.“ Antibiotika Monitor tom. XIV,

3/4 (1998) 55-60.

5. Huemer H.P., Grif K., Allerberger F., Rotter M.: „Diagnostik und Typisierung von *Bacillus anthracis* mittels Rapid-PCR und Ribotyping.“ *Antibiotika Monitor* tom. XIV, 5/6 (2001) 105-108.

6. Grif K., Karch H., Schneider C., Daschner F., Beutin L., Cheasty T., Rowe B., Dierich M.P., Allerberger F.: „Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157.“ *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 32 (1998) 165-176.

7. Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S.E., Richmond K., Adair D.M., Hugh-Jones M., Kuske C.R., Jackson P.: „Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers.“ *J. Bacteriol.* 179 (1997) 818-824.

8. Turnbull P.C.B.: „Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals.“ 3rd edition. WHO/EMZ/ZDI/98.6. (<http://www.who.int/emc>)

9. Henderson I.: „Fingerprinting *Bacillus anthracis* strains.“ *Salisbury Med. Bull.* 87, special suppl. (1996) 55-58.

10. Anderson G.L., Simchock J.M., Wilson K.H.: „Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species.“ *J. Bacteriol.* 178 (1996) 377-384.

11. Kaim P., Kalif A.S., Schupp J., et al.: „Molecular evolution and diversity of *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers.“ *J. Bacteriol.* 179 (1997) 818-824.

12. Jackson P.J., Walthers A., Kalif A.S., et al.: „Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrnA* from different *Bacillus anthracis* isolates.“ *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1400-1405.

13. Jackson P.J., Hugh-Jones M.E., Adair D.M., Green G., Hill K.K., Kuske C.R., Grinberg L.M., Abramova F.A., Keim P.: „PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlosk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1224-1229.

14. Swartz M.: (2001) „Recognition and management of anthrax – an update.“ *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 1621-1625.

15. Keim P., Smith K.L., Keys C., Takahashi H., Kurata T., Kaufmann A.: „Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan.“ *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 4566-4567.

16. Stroman D.W., McLeyan C, Rogers J.: „Discrimination between *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* strains by automated rRNA operon ribotyping.“ Abstracts of the 98th general meeting of the American Society for Microbiology, ASM, Washington DC (1998) 2005-4171.

17. RiboPrint® pattern provided by Joel B. Hansen.

18. Pfisterer R.M.: „Epidemiologie und Klinik des Milzbrandes.“ *Antibiotika Monitor* tom. XIV, 3/4 (1998) 48-54.

19. Greenberg D.S.: „War, bioterrorism and the political landscape.“ *Lancet* 358 (2001) 2137.

20. Anonymus: „Interim European surveillance case definition for anthrax.“ *Eurosurveillance Weekly* 5: 011101 (2001). (<http://www.eurosurv.org/2001/011101.htm>)

Anschrift des Verfassers:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Franz Allerberger
Institut für Hygiene und Sozialmedizin der Universität Innsbruck
A-6020 Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3
E-Mail: franz.allerberger@uibk.ac.at

Danksagung:

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung durch die European Commission (GENE project QLK2-2000-01404), den Jubiläumsfonds der Österreichischen Nationalbank (Projekt Nr. 9292) und das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur ermöglicht.

[zurück zum Inhalt](#)