FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Milzbrand

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Milzbrand

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Bacillus (B.) anthracis ist der Erreger des Milzbrandes, einer meist akut und oft tödlich verlaufenden Infektionskrankheit mit septikämischem Charakter. Haus- und Wildwiederkäuer sind hochempfindlich für Milzbrand. Schweine, Fleischfresser und auch Menschen (eher mäßig) sowie Vögel (Ausnahme Strauß) gelten als fast resistent. Die Krankheit ist weltweit verbreitet und kommt am häufigsten in Asien (Naher und Ferner Osten, Indien), Afrika und Südamerika vor; in Europa sind der mediterrane Raum und Osteuropa am stärksten betroffen.
Die Ansteckung erfolgt gewöhnlich durch die Aufnahme von Milzbrandsporen mit dem Futter oder Trinkwasser. Nur in Ausnahmefällen wird die Krankheit von Tier zu Tier übertragen. Auch eine Ansteckung über Milzbrandsporen enthaltende Stäube und Aerosole ist möglich.
Der Milzbranderreger bildet Sporen als Dauerformen, die sich über Jahrzehnte im Erdboden als ansteckungsfähig erhalten können. Milzbrandsporen werden weder durch Fäulnis noch durch Eintrocknen oder beim Gerben der Häute vernichtet.

1.2 Klinische Symptomatik

Milzbrand ist am lebenden Tier selten mit Sicherheit festzustellen.

Beim Rind und Schaf treten meist plötzliche Todesfälle auf. Aus den Körperöffnungen (Anus, Vulva, Mund, Nase) tritt dunkles, schlecht gerinnendes Blut. Erst bei der Zerlegung ist ein Verdacht auf Milzbrand festzustellen. Wenn weitere Tiere mit hohem Fieber, unregelmäßigem Puls, beschleunigter Atmung und evtl. Kolikerscheinungen erkranken, liegt der Verdacht auf Milzbrand nahe. Tierärztliche Behandlung ist nur dann Erfolg versprechend, wenn sie frühzeitig einsetzen kann.

Beim Pferd: plötzlich hochfieberhafte Erkrankung mit Kolik, Schling- und Atembeschwerden, Atemnot wegen Schwellung im Kehlgangsbereich, auch scheinbare Besserung und Tod nach mehreren Tagen.

Beim Schwein können Krankheitserscheinungen am lebenden Tier fehlen, in vereinzelten Fällen sind Atembeschwerden infolge Rachenentzündung sowie Verfärbung und Schwellung im Bereich des Kehlkopfes (Milzbrandbräune) zu beobachten. Die größte Zahl der Milzbrandfälle wird erst bei der Fleischbeschau oder in der Tierkörperbeseitigungsanstalt festgestellt.

1.3 Differentialdiagnostik

Pasteurellose, Rauschbrand, Pararauschbrand, Vergiftungen

1.4 Diagnostische Indikation

gemäß Milzbrand-Rauschbrand-VO siehe 1.6.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Zuständige Landesuntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
- Konsiliarlaboratorium für *B. anthracis* in Umweltproben, Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Stuttgart, Emil-Wolff-Straße 14, 70599 Stuttgart.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172) in der jeweils geltenden Fassung.
- Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines des OIE

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Gewinnung

Zur Untersuchung sollte nur frisch entnommenes Material verwendet werden.
Vom lebenden Tier: Blut aus der Ohrvene (*B. anthracis* ist nur 16 bis 18 h vor dem Tod im Blut nachweisbar)
Vom toten Tier: Ganze Kadaver, Sektionsmaterial, aber auch Blutausstriche und tierische Produkte wie Häute, Haare, Wolle, Tierkörpermehle

2.2 Transport und Lagerung

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender kurzzeitiger Lagerung ist das Material kühl bei +7 °C ± 3 °C aufzubewahren.

Untersuchungsmaterial vorschriftsmäßig gemäß der entsprechenden Gefahrgutverordnung Straße (ADR) und Eisenbahn (RID), Luftverkehr (IATA-DGR), DIN EN 829 in der jeweils geltenden Fassung, in dicht schließenden Behältnissen verpackt, gekennzeichnet, zusammen mit Vorbericht und Untersuchungsantrag nach vorheriger telefonischer Absprache schicken.
Wegen möglicher Gefährdungen während des Transportes sollte Milzbrand-verdächtiges Untersuchungsgut durch Kurier übermittelt werden.

Die Proben sind mit dem entsprechende Einsendebogen an das FLI zu senden. Dieser kann unter folgendem Link heruntergeladen werden: https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-milzbrand/

3. Untersuchungsgang

Vorsichtsmaßnahmen

Der Umgang mit potentiell *B. anthracis*-haltigem Material und Kulturen ist genehmigungspflichtig und darf nur in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 vorgenommen werden und die entsprechenden Maßnahmen für biologische Sicherheit sind zu beachten.

3.1 Erregernachweis

Der Nachweis von *B. anthracis* sollte durch eine Kombination von mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

3.1.1 Kulturelle Untersuchung

Die kulturelle Anzüchtung gilt als sehr sichere Nachweismethode. Als Ausgangsmaterial werden o. g. Materialien empfohlen. (Rezepturen s. Anhang)

Anreicherung

Eine Anreicherung ist üblich besonders bei der Untersuchung von Futtermitteln, die Tierkörpermehle enthalten, aber auch bei Häuten, Haaren, Wolle, Oberflächentupfern und Umweltproben. Beimpfung einer Nährbouillon, die mindestens 18 h bei 37°C aerob bebrütet wird. Kontaminiertes Material sollte mit der selektiven Anreicherungsbouillon für *B. anthracis/ B. cereus*-Sporen angereichert werden.

Schon nach 6 h Schütteln bei 37 °C wird die exponentielle Wachstumsphase erreicht und man kann auf Selektivnährmedien (s. u.) überimpfen. Zur Sicherheit sollte die angesetzte Bouillonkultur bis 18 h bei 37 °C weiter bebrütet und danach auf Selektivnährmedien ausgestrichen werden.

Wird das Untersuchungsmaterial zur Ausschaltung der vegetativen Kontaminanten für 20 min bei 65 °C erhitzt, kann die angegebene Anreicherungsbouillon für *B. anthracis/B. cereus* auch ohne Hemmstoffe verwendet werden. Dadurch verkürzt sich die Anreicherungszeit auf 4 h Schütteln bei 37 °C (Reissbrodt, 2004). Bei Untersuchung von frischem Kadavermaterial entfällt die Erhitzung vor der Anreicherung.

Direktkultur

Diese erfolgt auf festen Nährmedien wie Blutagar oder den unten angeführten Selektivnährmedien. Hierbei sind stets mehrere Platten zu verwenden. Die Beimpfung erfolgt direkt oder nach Vorbehandlung und/oder Anreicherung (s. o.). Die Platten werden mindestens 18 h bei 37 °C aerob bebrütet.

Infolge morphologischer Ähnlichkeiten kommt der Abgrenzung zwischen *B. anthracis* und seinen taxonomisch nächsten Verwandten *B. cereus, B. thuringiensis* und *B. mycoides* (*B. cereus*–Gruppe) besondere praktische Bedeutung zu.

Weiterhin sind differentialdiagnostisch einige Antibiotika bildende Arten von Interesse, wie z. B. *B. polymyxa* (Polymyxin B), *B. brevis* (Tyrothricin), *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* (Bacitracin).

Auch *B. megaterium* (Erdbazillus) kann im Rahmen der Differentialdiagnostik eine Rolle spielen.

Nach 18- bis 24-stündiger Bebrütung sind Kolonien von *B. anthracis* mittelgroß bis groß (etwa 0,5 cm), mattglänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert, mit flockig-spiraliger Oberfläche und von butterartiger Konsistenz, „Eischneeeffekt“, auf Blutagar ohne Hämolyse.

Selektive Nährmedien

TMSP-Agar

Auf diesem semiselektiven Nährboden finden *Bacillus* spp. eine gute Nährstoffbasis, um schnell zu charakteristischen großen Kolonien auszuwachsen. Das Wachstum von *B. subtilis* und *B. megaterium* ist vollständig gehemmt. Das Wachstum von Staphylokokken, von Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa und Enterokokken ist entweder ebenso vollständig gehemmt oder stark reduziert. Der Zusatz von Schafblut unterstützt das Wachstum, gleichzeitig ist das Auftreten einer starken Hämolyse um die Kolonien der anderen *Bacillus* spp. – wie *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. licheniformis* – ein hervorragendes Differenzierungsmerkmal zu *B. anthracis*. *B. anthracis*-Stämme wachsen als weiße, große Kolonien (2 bis 6 mm im Durchmesser) mit charakteristischer stumpfer Oberfläche ohne Hämolyse (Tab. 2).

Chromogene Selektivnährmedien

Zur weiteren Differenzierung der *Bacillus* spp. wird das beschriebene BCM® *B. cereus/B. thuringiensis*-Plating-Medium auch als Fertigplatte Cereus-Ident-Agar erhältlich, empfohlen. Dieses ursprünglich im Rahmen der *B. cereus-/B. thuringiensis*-Diagnostik eingesetzte Nährmedium ermöglicht eine optisch klare Differentialdiagnostik innerhalb der Bacillus spp. Alle Spezies, welche die Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) enthalten und in der Lage sind, das chromogene Substrat X-myoinositol-1-phosphat zu spalten, wachsen meist als türkise Kolonien (z. B. *B. cereus, B. thuringiensis*). Allerdings gibt es auch weiß wachsende Kolonien, die zu Fehlinterpretationen führen können. *B. anthracis* wächst mit einem Durchmesser wie *B. cereus* (ca. 4 mm), aber als stumpfe, weiße Kolonie (Tab. 2). Eine grampositive oder gramnegative Begleitflora wird dabei weitgehend oder vollständig gehemmt (Reissbrodt *et al.*, 2004).

Milzbrand

Phagentest

Der Phagentest wird unter Anwendung des für *B. anthracis* spezifischen Gamma-Phagen durchgeführt. Als Ausgangskultur kann einerseits eine 3- bis 4-stündige Nährbouillonkultur oder eine leicht trübe Suspension des verdächtigen Koloniematerials in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder auch mit dem resuspendierten Koloniematerial direkt verwendet werden. Stets sollte als Positivkontrolle ein gut charakterisierter Milzbrandstamm und als Negativkontrolle ein *B. cereus*-Stamm bei gleicher Präparationstechnik in die Untersuchung einbezogen werden.

Durchführung:

Auf Blutagar wird auf der Rückseite der Petrischale mit Schablone eine kreisrunde Fläche (Ø 2 cm) markiert. Auf dieser Fläche wird das Probenmaterial verteilt. Den Inhalt einer Öse mit Phagensuspension (Titer mindestens 108) exzentrisch auf diesen Bereich auslaufen lassen, (Flüssigkulturen müssen vorher erst eintrocknen). Im günstigen Falle erkennt man schon nach 4 bis 6 Stunden ein zartes Wachstum und das typische Phagenloch, wenn es sich um *B. anthracis* handelt.

Der Ansatz wird bei 37 °C bebrütet und frühestens nach 5 Stunden und optimal nach 24 Stunden abgelesen.

Beweglichkeitstest

Die Prüfung der Beweglichkeit des Bakteriums erfolgt auf halbfestem Agar. Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

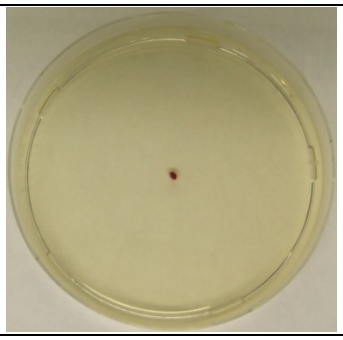
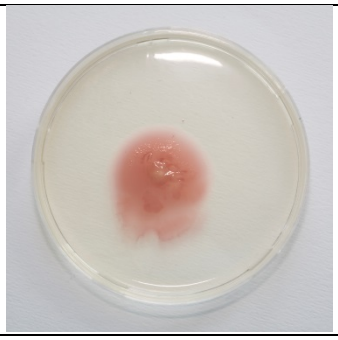
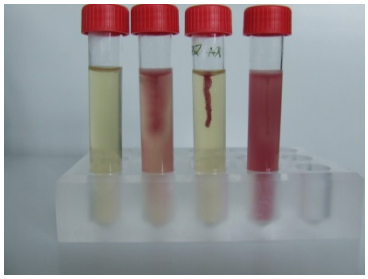
Durchführung:

Koloniematerial (nur wenig!) wird nur mit der Pipettenspitze angetippt und in die Mitte eines halbfesten TTC-haltigen Nähragars gedrückt.

Platte nicht umdrehen, 24 Stunden bebrüten bei 37 °C.

Auswertung:

Unbeweglich: *B. anthracis*	Beweglich: *B. cereus*	Alternativ im Röhrchen: a-unbeimpft, b,d-beweglich c-unbeweglich a b c d

3.1.2 Kapseldarstellung

Virulente bekapselte *B. anthracis* sind im Gewebe, Blut oder anderen Köperflüssigkeiten von frisch an Milzbrand verendeten Tieren präsent (s. Anhang). Nach Kultivierung auf künstlichen Nährmedien geht die Kapsel jedoch rasch verloren. Der Kapselnachweis in Kulturen ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5- bis 7%iger CO_2-Atmosphäre kultiviert wurden, kann aber auch hier teilweise nur begrenzt erfolgen (s. Anhang). Auch eine Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut führt nicht regelmäßig zur Ausprägung einer deutlichen Kapsel. Gelingt die Kapseldarstellung jedoch, ist sie ein Hinweis auf das Vorhandensein eines virulenten *B. anthracis*, da andere *Bacillus* spp., wie z. B. *B. subtilis, B. mesentericus, B. cereus* keine Kapsel haben.

3.1.3 Molekulare Nachweisverfahren

Für den Nachweis von *B. anthracis* in DNA-Präparationen aus Blut- oder Organmaterial bzw. aus Kulturmaterial stehen verschiedene Realtime-PCRs mit TaqMan- oder FRET-Sonden zur Verfügung. Der Nachweis der beiden Virulenzplasmide pX01 (kodierend für protektives Antigen) und pX02 (kodierend für Kapselantigen) reicht für den Nachweis eines virulenten *B. anthracis* Isolates aus.

Nicht alle beschriebenen chromosomalen Marker sind spezifisch für *B. anthracis*. Der chromosomale Marker PL3 (Prophage LambdaBa03) wurde als besonders spezifischer Marker identifiziert. (Agren *et al.*, 2013; s. Anhang).

Anhang

1. Nährmedien

Blutagar

Brucella-Agar (oder andere Blutagarbasis, siehe z. B. die folgende Rezeptur) mit Zusatz von 5 % defibriniertem Blut von Schafen, Pferden, Rindern oder Kaninchen. Weiter wird empfohlen:

Bacto-Pepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Na_2HPO_4 x $12H_2O$	2,0 g
Fleischextrakt	6,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml
pH = 7,2 ±0,2	

TMSP-Agar

Standard-Agar	40,0 g
Trimethoprimlactat Salz	13,1 mg
Sulfamethoxazol	20,0 mg
Polymyxin B	30 000 Einheiten
Schafblut	50,0 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml
pH 7,3 ± 0,2	

Die Zusätze werden als Sterilfiltrate präpariert und nach Abkühlung des autoklavierten Agarmediums auf 50 °C zugesetzt. Trimethoprim kann als 100-fache Stammlösung in Wasser angesetzt und bei -20 °C in Aliquots gelagert werden.
Eine 100-fache Lösung von Sulfamethoxazol kann durch Zusatz von 600 µl 10 % NaOH zu 100 ml Wasser und Erhitzung der Lösung auf 80 °C hergestellt werden.

Chromogene B. cereus-Selektivnährmedien

BCM® Bacillus-cereus/Bacillus-thuringiensis Plating-Medium (Pulver)
Catalog-Nr. C-0710

BCM® Bacillus-cereus/Bacillus-thuringiensis-Supplement
Catalog-Nr. C-0712

Zur Herstellung der Platten wird das Basismedium (Pulver) gelöst und autoklaviert, das chromogene Substrat und die Hemmstoffe werden als sterile Supplementlösung vor dem Ausgießen zugesetzt.
Das BCM® *Bacillus-cereus/Bacillus-thuringiensis*-Plating-Medium (Biosynth) steht leicht variiert als Fertigplatte unter dem Namen Cereus-Ident–Agar (Heipha Art.-Nr. 174e) zur Verfügung.

Cereus-Ident-Agar

Columbia-Agar	42,5 g
Wachstumssupplement	4,0 g
Chromogenes Selektivsupplement	2,45 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml
pH 7,3 ± 0,1	

Anreicherungsbouillon für *B. anthracis/B. cereus* (Rassbach und Reissbrodt, 2002)

Basis	
Nutrient Broth (Difco, BD)	für 1 l
Tryptone (Difco, BD)	5,0g
NaCl	5,0g
K_2HPO_4	4,0g
Sterilisation 15 min 121 °C	
pH 7,3 ± 0,1	
Supplemente (als sterile Lösungen zugeben)	
D-Glucose	2,0g
Trimethoprim	0,0032g
Sulfamethoxazol	0,016g
Polymyxin B	0,020g
Cycloheximid	0,200g

Halbfestes Nährmedium zur Beweglichkeitsprüfung

Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

NB I- Bouillon	für 1 L
Standard-Agar	2,5 g
lösen, autoklavieren (15 min bei 121 °C)	
2,3,5,-Triphenyltetrazolium chlorid (steril zusetzen)	0,05 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

2. Kapseldarstellung

2.1 Kapselfärbung mit AzurB (Owen *et al.*, 2013)

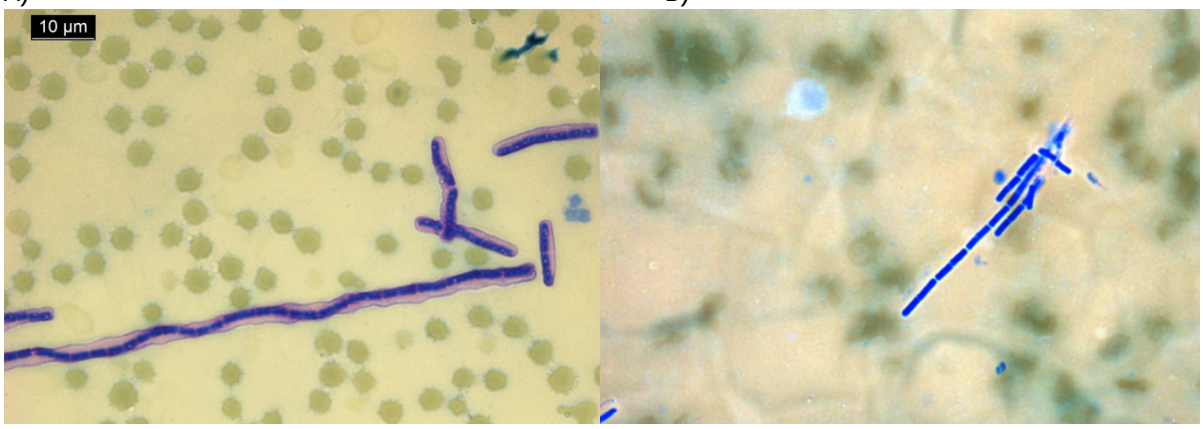
Herstellung der Färbelösung: 0,003 g Azur B (Fa. Sigma) in 3ml 95%igem Ethanol oder Methanol lösen
Färbelösung ist sofort einsetzbar
Haltbarkeit bei Raumtemperatur (dunkel) mind. 12 Monate

Für einen Direktausstrich einen Tropfen Blut auf ein Ende des Objektträgers bringen und mit Hilfe eines angeschliffenen Deckglases einen sehr dünnen Ausstrich bzw. ein Abklatschpräparat von Gewebeproben anfertigen. Die Kapselbildung kann auch durch Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut angeregt werden.

- Präparat lufttrocknen
- in absolutem Ethanol oder Methanol für 10 Minuten fixieren
- mit Azur B-Lösung 5 Minuten färben
- mit Leitungswasser abspülen, und trocknen lassen
- mikroskopische Beurteilung bei 1000facher Vergrößerung

Ergebnis:

A) B)



Kapselfärbung mit AzurB nach Kultivierung in defibriniertem Pferdeblut: B. anthracis (A, mit rosa angefärbter Kapsel) und B. cereus (B, ohne Kapsel).

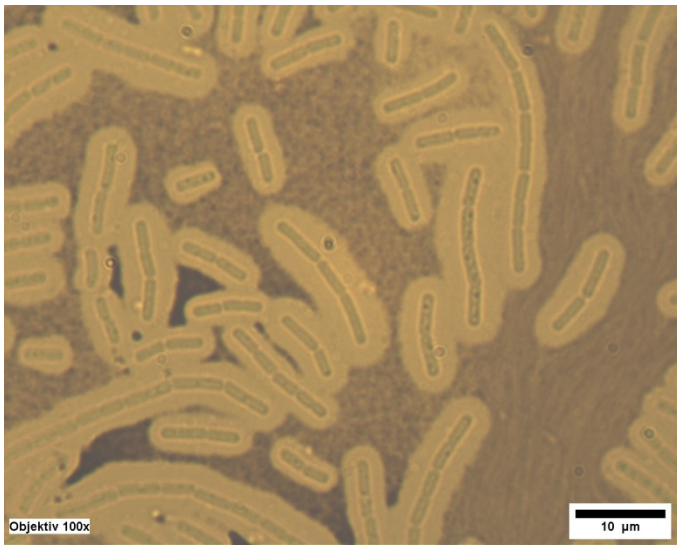
2.2 Kapseldarstellung durch Tusche (nur aus Kulturmaterial)

Der Kapselnachweis in Kulturen durch Tusche ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5- bis 7%iger CO_2-Atmosphäre kultiviert wurden.

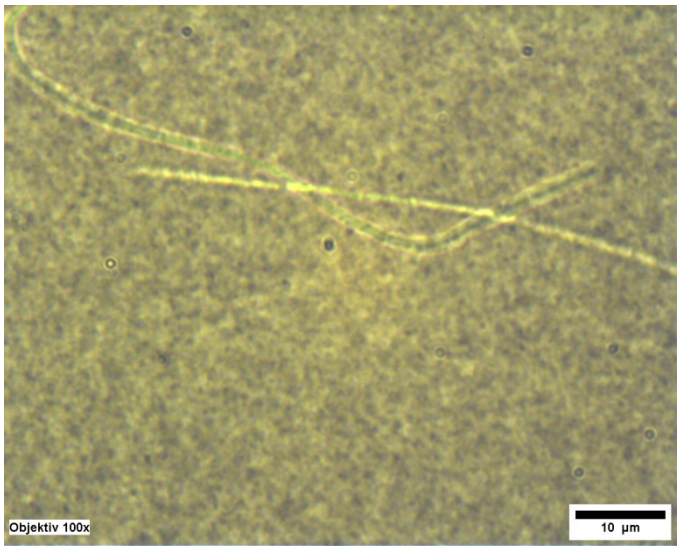
- eine Öse Bakterienmasse von einer bikarbonathaltigen Agarplatte in 1 ml 10%ige Formaldehydlösung resuspendieren, 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- zentrifugieren 5 min, 13000 rpm
- Überstand verwerfen
- ein Tropfen vom Sediment mit einem Tropfen Tusche in einem 1,5 ml-Tube mischen
- davon 1 Tropfen auf einen Objektträger übertragen und mit Deckglas abdecken
- Beurteilung bei 1000-facher Vergrößerung

Ergebnis:

A)



B)



Kapseldarstellung durch Tusche: B. anthracis (A, mit hell leuchtender Kapsel), B. cereus (B, ohne Kapsel)

3. Realtime-PCRs zum Nachweis von pathogenem *Bacillus anthracis*

3.1 TaqMan-Sonden PCR

Der Nachweis basiert auf der Amplifikation *B. anthracis*-spezifischer Sequenzabschnitte: dem Gen des protektiven Antigens auf Plasmid pXO1 sowie dem Gen des Kapselantigens auf Plasmid pXO2 (Ellerbroek, H. *et al*., 2002).

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA- S		CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA
BAPA- R		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-TM	5'-FAM-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAAT BHQ-1-3'
CAP-S		ACGTATGGTGTTTCAAGATTCATG
CAP-R		ATTTTCGTCTCATTCTACCTCACC
	CAP-TM	5'-FAM-CCACGGAATTCAAAAATCTCAAATGGCAT-BHQ-1-3'

Verdächtiges Koloniematerial (in 1 ml HPLC-Wasser resuspendieren, erhitzen bei 110 °C, 20 Minuten, filtrieren durch 0,2 µm Filter) kann direkt als PCR-Template eingesetzt werden. DNA-Isolierung (z. B. QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Invisorb Spin Tissue Mini Kit, InVitek;) entsprechend den Hinweisen der Hersteller.

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z. B. Taqman Universal Mastermix #4304437, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10µM)
0,5 µl	Sonde (10µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (MX3000 Stratagene):

Dekontamination bei 50 °C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95 °C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95 °C, 25 sek; 60 °C, 1 min.

3.2 TaqMan-Sonden-Multiplex PCR

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: auf Plasmid pXO1, auf Plasmid pXO2 sowie dem auf dem bakteriellen Chromosom.

Charakteristische Parameter der PCR (modifiziert nach Wielinga *et al*., 2011)

Zielgen	pXO1 Marker (Ödemfaktorgen cya)	pXO2 Marker (capB-Gen)	Chromosomaler Marker (Prophage lambdaBa03 -PL3)
Primerpaar	cyapri_f/ cyapri_r	caBpri2_f/ caBpri2_r	PL3_f/ PL3_r
Sonde	Tqpro_cya HEX	Tqpro_caB CY5	Tqpro_PL3 FAM

Primer und Sonden:

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
PL3_f		AAAGCTACAAACTCTGAAATTTGTAAATTG
PL3_r		CAACGATGATTGGAGATAGAGTATTCTTT
	Tqpro_PL3	FAM-AACAGTACGTTTCACTGGAGCAAAATCAABHQ1
cyapri_f		AGGTAGATTTATAGAAAAAAACATTACGGG
cyapri_r		GCTGACGTAGGGATGGTATT
	Tqpro_cya	Hex-CCACTCAATATAAGCTTTATTACCAGGAGCBHQ1
caBpri2_f		AGCAAATGTTGGAGTGATTGTAAATG
caBpri2_r		AAAGTAATCCAAGTATTCACTTTCAATAG
	Tqpro_caB	CY5-AGGTCCCATAACATCCATATGATCTTCTAABHQ2a

Der chromosomale Marker PL3 wird als besonders spezifisch für *B. anthracis* angesehen (Agren *et al*., 2013).

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z.B. TaqMan Environmental Mastermix, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10µM)
0,5 µl	Sonde (10µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (MX3000 Stratagene):

Dekontamination bei 50°C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95°C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95°C, 25 sek; 60°C, 1 min.

3.3 FRET-Sonden

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: dem Gen des protektiven Antigens (pag) auf Plasmid pXO1, dem Gen des Kapselantigens (capC) auf Plasmid pXO2 sowie spezifischer genomischer Sequenzen auf dem sasp-Gen (small acid soluble spore protein). Der Nachweis der genomischen Sequenzen auf dem sasp-Gen allein ist nicht spezifisch für *B. anthracis*.

Milzbrand

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA-S[3]		CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA
BAPA-R[3]		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-FL[1]	TGCGGTAACACTTCACTCCAGTTCGA
	BAPA-LC[1]	Red 640 CCTGTATCCACCCTCACTCTTCCATTTTC-P
CapS[3]		ACGTATGGTGTTTCAAGATTCATG
Cap A**[2]		GATTGCAAATGTTGCACCACTTA
	CapC-FL+[1]	TATTGTTATCCTGTTATGCCATTTGAGATTTTT
	CapC-LC[1]	Red640 AATTCCGTGGTATTGGAGTTATTGTTCC- P
ANT-F+[2]		GCTAGTTATGGTACAGAGTTTGCGAC
ANT-Amt[1]		CCATAACTAGCATTTGTGCTTTGAAT
	ANT-FL[1]	CAAGCAAACGCACAATCAGAAGCTAAG
	ANT-LC[1]	Red640 GCGCAAGCTTCTGGTGCTAGC-P

[1]Beyer et al., 2003; [2]Mauch, H. et al., 2008; [3]Ellerbroek, H. et al., 2002

PCR-Ansatz:

4 µl	Fertig-Reaktionmix (z. B. LighCycler: Lightcycler FastStart DNA Master Plus Hybprobe,Roche, 5x)
8,6 µl	HPLC-Wasser
1 µl	je Primer (10µM)
1 µl	je Sonde (4 µM)
2 µl	Template

Literatur

- BROWN, E. R. and Cherry, W. B. (1955): Specific identification of Bacillus anthracis by means of a variant bacteriophage. J. infect. Dis. 96, 34-39.
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-J. und WEINKE, TH. (1993): Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. In: Bakterielle Zoonosen bei Mensch und Tier, Kapitel 12 Milzbrand. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 181-197.
- HALLMANN, L. (1961): Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das bakteriologische und serologische Laboratorium. In: Bakteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Aufl.
- RASSBACH, A. und R. REISSBRODT **(**2002): Milzbrand, p. 176-191. *In* Arbeitsanleitungen zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen nach der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 23. Mai 1991 (BGBl, I S. 1178) in der jeweils geltenden Fassung. Aktualisierte Fassung. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Berlin, Germany.
- REISSBRODT, R, A. RASSBACH, B.BURGHARDT,I. RIENÄCKER, H. MIETKE, J. SCHLEIF, H. TSCHÄPE, M. LYTE, AND P.H.WILLIAMS (2004): Assessment of a New Selective Chromogenic Bacillus cereus Group Plating medium and Use of Enterobacterial Autoinducer of Growth for Cultural Identification of Bacillus Species. Journal of Clinical Microbiology, 3795- 3798
- BEYER, W., BARTLING, C., NEUBAUER, H., Zum Stand der Nachweisverfahren für Bacillus anthracis in klinischen und Umweltproben. Tierärztliche Umschau 58, 653-662 (2003)
- MAUCH, H. PODBIELSKI, A, HERRMANN, A. KIEHL, E. MIQ 26 Teil I, 2008- Mikrobiologische-infektiologische Qualitätsstandards. ELSEVIER Urban & Fischer, München, Jena
- ELLERBROEK, H., NATTERMANN, H., ÖZEL, M., BEUTIN, L., APPEL, B., PAULI, G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by realtime PCR. FEMS Microbiol.Lett, 2002; 214(1): 51-9.
- QI, Y., G. PATRA, X. LIANG, L.E. WILLIAMS, S. ROSE, R.J. REDKAR AND V.G. DE VECCHIO (2001) Utilization of the rpoB Gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis. Appl. Env. Microbiol. 67, 3720-3727.
- OIE: Anthrax. In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, World organisation for animal health.

Milzbrand

- OWEN, M.P., SCHAUWERS, W., HUGH-JONES, M.E., KIERNAN, J.A.,TURNBULL P.C.B, BEYER, W. A simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule. Journal of Microbiological Methods 92 (2013) 264–269.
- PETER R. WIELINGA, RADITIJO A. HAMIDJAJA, JOAKIM ÅGREN, RICKARD KNUTSSON, BO SEGERMAN, MARTINA FRICKER, MONIKA EHLING-SCHULZ, ASTRID DE GROOT, JANE BURTON, TIM BROOKS, INGMAR JANSE, BART VAN ROTTERDAM; A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating B. anthracis virulent types International Journal of Food Microbiology 145 (2011) S137–S144.
- JOAKIM ÅGREN, RADITIJO A HAMIDJAJA, TRINE HANSEN, ROBIN RUULS, SIMON THIERRY, HÅKAN VIGRE, INGMAR JANSE,ANDERS SUNDSTRÖM, BO SEGERMAN, MIRIAM KOENE, CHARLOTTA LÖFSTRÖM, BART VAN ROTTERDAM, AND SYLVIANE DERZELLE In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detection of Bacillus anthracis chromosomal signature sequencesVirulence 4:8, 671–685; November 15, 2013
- Anthrax in Humans and Animals, 4th edition. WHO 2008, ISBN 978-92-4-154753-6

Tabelle 1: Einige Differenzierungsmerkmale zwischen *B. anthracis* und anderen *Bacillus* spp. (nach Dedie *et al.*, 1993, mod.)

	spezifische Tests				**weniger spezifische Tests**		
	Beweglich-keit	**Hämolyse**	**Phagen-lysis**	**Mäusepatho-genität**	**Kolonieform**	**Wachstum in Bouillon**	**Penicillin-empfind-lichkeit**
B. anthracis	-	keine Hämolyse (selten späte Vergrünung)	+	+ (bekapselte Stämme)	Matt glänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert	klar mit feinflockigem Bodensatz	+ (70 %)
B. cereus	+ *(90 %*)*	meist starke b-Hä-molyse	-	± (25 bis 80 %*)	flach, rauh, rhizoid	trüb mit Sediment	-
B. mycoides	- *(meist)*	± (positiv: Pfer-deblut; variabel: Schafblut)	-	- (10 %*)	Oberfläche stumpf	klar, anfangs mit Häut-chen, das absinkt	-
B. megaterium	± *(meist schwach beweglich)*	b-Hämolyse	-	-	rund, glattrandig	trüb	+

** Zahl in Klammern: Prozentsatz der Stämme mit positiven Reaktionen*

Tabelle 2: Wachstum und Koloniemorphologie von *Bacillus spp.* auf verschiedenen Nährmedien (37 °C, 24 h)

Nährmedien	**TMSP-Agar**		**Blutagar**		**Cereus-Ident-Agar**
Spezies	**Wachstum**	**Hämolyse**	**Wachstum**	**Hämolyse**	**Wachstum, Koloniefarbe**
B. anthracis	groß, weiß	ø	weiß	ø	groß, weiß
B. cereus-Wildstämme	groß, cremef.	+ (meist)	weiß	+	groß, meist türkis*, **
B. thuringiensis	weiß	+	weiß	+	helltürkises Zentrum weißer Rand **
B. subtilis	kein	-	weiß	+	schwaches Wachstum, helltürkis
B. mycoides	grauweiß, fädrig	+	weiß	+	weiß, fädrig
B. lichenformis	kein	-	hell	ø	kein
B. megaterium	kein	-	weiß	ø	helltürkis

*teilweise türkiser Hof um Kolonien ** ausnahmsweise weiß wachsende Kolonien möglich

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.~~bund.~~de