**Abschlussbericht**

**Vorhabensbeschreibung des Teilprojektes des Max von Pettenkofer-Instituts (MvP) im beabsichtigten Verbundforschungsvorhaben: „**Aufbau eines Real-time PCR basierten Testkits zur Point-of-Care Diagnose sicherheitsrelevanter Erreger (B-Pathogen-Panel)“

**Titel des Teilvorhabens:** „Etablierung von Real-time PCR-basierte Techniken und Protokolle zur *Yersinia pestis* Point-of-Care Diagnose“

**Projektleiter (für Teilprojekt MvP):**

Dr. Alexander Rakin
Ludwig-Maximilians-Universität München
Max von Pettenkofer-Institut, Lehrstuhl Bakteriologie
Tel. 089-5160 5275, Fax 089-5160 5223.
rakin@mvp.uni-muenchen.de

**Verbundkoordinator**

FRIZ Biochem
Gesellschaft für Bioanalytik mbH
Dr. Gerhard Hartwich
Floriansbogen 2-4, 82061 Neuried
Tel: +49 (0)89 72440925, Fax: +49 (0)89 72440910
gerhard.hartwich@frizbiochem.de

**Laufzeit des Teilvorhabens**: 24 Monate

## 1. Ziel des Teilvorhabens

Das Ziel dieses Teilprojekts ist die Entwicklung eines Nukleinsäure-basierten Multiplex-Testsystems auf einer multiparametrischen Real-time PCR-Plattform mit einer einfachen und sicheren Probeentnahme vor Ort und einer elektrochemischen Detektion von hoch-pathogenen *Y. pestis*.

## 2. Einleitung

Die Pest ist eine durch *Yersinia pestis* verursachte Zoonose von Wildnagern und Ratten. Es gibt Naturherde in Afrika, Asien und Amerika. *Y. pestis* kann durch Rattenflöhe (*Xenopsylla cheopis*) oder Fraß von infizierten Tieren und Kadavern, übertragen werden (1, 3, 6, 12, 18, 19). Von Mensch zu Mensch besteht ein Übertragungsrisiko durch Tröpfcheninfektion bei Kontakt zu Patienten mit Pestpneumonie (3, 8). Die Pest könnte infolge eines Imports aus endemischen Staaten oder aufgrund von Bioterrorismus wieder auftreten.

Die infektiöse Dosis von *Y. pestis* ist sehr gering (etwa 10 - 100 Bakterien). Die primäre Pestpneumonie tritt innerhalb von 1-3 Tagen nach Inhalation von Bakterien akut und fulminant ein. Die unbehandelten Fälle der Bubonenpest weisen eine Letalität von 50-60% auf, bei der Lungenpest und der Pestsepsis beträgt die Letalität nahezu 100% (3, 8, 13).

Zurzeit das *caf1*-kodierte Fra1-Kapselantigen ist das wichtigste für die Pest-Diagnostik relevante Antigen (4, 9, 16). Derzeit gibt es jedoch keinen kommerziell verfügbaren Test zum Nachweis von F1-Antigen oder anderen Antigenen für diagnostische Zwecke. Zahlreiche konventionelle und Real-Time PCRs wurden für den spezifischen Nachweis von *Y. pestis* publiziert, sind jedoch weiterhin nur Speziallaboratorien vorbehalten. Auch solche zertifizierten Tests stehen für die Pest zur Zeit nicht zur Verfügung.

Trotzdem konnten auch hoch-virulente Stämme, die nicht das Fra1-Kapselantigen tragen, aus der Natur isoliert und auch im Labor konstruiert werden (21, 22). Gensequenzen von zwei *Y. pestis* Plasmiden, pPla (*pla*, codiert einen Plasminogenaktivator) und pYV (*lcrV*, verantwortlich für die Synthese des V-antigen) wurden zusätzlich als diagnostische Marker einbezogen (16, 17). Nichtsdestotrotz kann auch das pPst Plasmid in eineigen virulenten Stämmen fehlen und *lcrV* ist ein unspezifischer Marker, weil die eng verwandten enteropathogene Yersinien ihn ebenso besitzen.

In Kooperation mit einer chinesischen Arbeitsgruppe (Prof. R. Yang) wurden weitere chromosomale Regionen identifiziert, die für die spezifische Detektion von *Y. pestis* geeignet sind (5). Diese Sequenzen werden analysiert und als zusätzliche, *Y. pestis* – spezifische chromosomale Marker für die Pest-Diagnostik und -Charakterisierung getestet.

Da eine wirksame Medikation entscheidend für einen günstigen Therapieverlauf ist, sollte vor der Wahl des Therapeutikums das Resistenzspektrum des Erregers bestimmt werden.

Die Peststämme mit Plasmid-kodierten Resistenzen gegen Fluorchinolone, Tetrazyklin und Streptomycin wurden in Vietnam und Madagaskar aus Patienten isoliert (7). Die Antibiotika-Resistenztestung erfolgt nach 24 Stunden mittels Agardiffusionstest. Deswegen müssen neue molekulare Tests zur raschen Erkennung von Antibiotikaresistenzen entwickelt werden. Deshalb werden in das zu etablierende Nachweisverfahren zusätzliche Targets für die Detektion von gängig eingesetzten sowie alternativen Antibiotika (Fluorchinolone, Streptomycin, Tetrazyklin, etc.) mit eingebracht (10, 14, 20).

Wegen der Gefährlichkeit von *Y. pestis* muss die Materialbearbeitung und Diagnostik immer in einem Speziallabor durchgeführt werden. In den Proben enthaltene potentielle hochinfektiöse Erreger sollen beim Auftragen auf die „FTA-Karten“ von der Firma Whatman inaktiviert werden; diese erlauben die Sammlung, den Transport und die Archivierung von Nukleinsäuren von biologischen Proben bei Raumtemperatur.

Das Ziel dieses Projekts ist die Etablierung von Real-time PCR-basierten Techniken und Protokollen zur *Yersinia pestis* „Point-of-Care Diagnostik“.

## 3. Ausführliche Beschreibung des Arbeitsplans

***Tabelle 1**: Übersicht über die Arbeitspakete und die voraussichtlichen Mannmonate (WA / MTA)*

| **Arbeitspakete** | **MvP** |
|---|---|
| **1. Herstellung des Referenzmaterials** | |
| 1.1 Definition und Anzucht der Referenzstämme | 1/1 |
| 1.2 Herstellung der Referenz-DNA | 0/1 |
| **2. Assaykonzeption** | 1/0 |
| **3. Probenvorbereitung mit FTA-Karten** | |
| 3.1 Konzeption | 1/0 |
| 3.3 Überprüfung und Optimierung der Inaktivierung der Erreger | 0/2 |

| | |
|---|---|
| 3.4 Vergleichstests mit konventionellen Methoden | 0/2 |
| 3.5 Umsetzung der Protokolle an der Kartusche | 1/1 |
| **5. Singleplex-PCR** | |
| 5.1 Konzeption / Bioinformatik | 1/0 |
| 5.2 Vortests Isolierung und Aufreinigung | 1/4 |
| 5.4 Anpassung an Kartusche | 1/1 |
| **6. Multiplex PCR** | |
| 6.1 Konzeption und Bioinformatik | 1/0 |
| 6.2 Validierung mit Standard | 1/4 |
| 6.3 Anpassung an Kartusche | 1/0 |
| 6.4 Validierung mit Kartusche | 0/1 |
| **9. Resistenztestung** | |
| 9.1 Konzeption und Bioinformatik | 1/0 |
| 9.4 Anpassung an Kartusche | 1/0 |
| 9.5 Validierung mit Kartusche | 0/1 |

**AP 1: Herstellung des Referenzmaterials**

Ein Panel von *Y. pestis* Stämme mit verschiedenen Genomvariationen (pFra, pYV, pPla Plasmide und *pgm* chromosomaler Locus Verlust) wurden konstruiert und molekularbiologisch überprüft.

***Tabelle 2**: Y. pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* Stämme DNS.

| **Stamm** | **pFra** | **pYV** | **pPla** | **pgm** |
|---|---|---|---|---|
| Kuma, „A“ | + | - | + | + |
| YOKOHAMA „A“ | + | - | + | + |
| KIM „M“ | + | - | + | + |
| M23 „O“ | + | - | + | + |
| TS „O“ | + | - | + | + |
| G32 „O“ | + | - | - | + |
| G32 „O“ pgm | + | - | + | - |
| 6/69 „O“ | + | - | + | + |
| 6/69 „O“ pgm | + | - | + | - |
| EV76 „O“ No 85 | + | + | + | - |
| EV76 pYP- | + | + | - | - |
| EV76 p YV- | + | - | + | - |
| EV76 pYP- pYV- | + | - | - | - |
| EV76 pYP- pYV- pFra- | - | - | - | - |
| Y. pestis 142 R | - | + | - | - |
| Y. pestis142 R – 5 | - | - | - | - |
| Y. pestis 320 | + | + | - | - |
| Pestoides G8786 | + | + | - | + |
| Pestoides G8786-1 | + | - | - | + |
| Y. pstbc 488 | - | + | - | + |
| Y. pstbc IP32953 | - | + | - | + |
| Y. pstbc IP31758 | - | + | - | + |

17 – 35 µl hochgereinigte DNA von 20 typischen und auch „atypischen“ *Y. pestis* Stämme dieses Panels (Stämme mit Genom Variationen)(12, 15, 22) und phylogenetisch eng verwandten und differential-diagnostisch relevanten *Yersinia pseudotuberculosis* Stämmen wurden allen Projektpartnern für die Etablierung der Real-time PCR-Protokolle in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt.

**AP 2: Assaykonzeption**

In diesem Arbeitspaket wurden die PCR Parameter, Primer und Sonden zur *Y. pestis* Identifizierung und Resistenzbestimmung sowie Vorgehensweisen zum Multiplexen der etablierten Singleplex-Tests definiert und festgelegt, um die allgemeine Abstimmung aller Projektpartner anzupassen (sehe AP 5, AP6 und AP 9).

**AP 3: Probenvorbereitung mit FTA-Karten**

Einsetzbarkeit von der Firma Whatman / GE Healthcare entwickelten FTA-Karten für das Arbeiten wurden mit attenuiertem *Y. pestis* EV76 (seit 2003 ist dieser Stamm beim ZKBS in die Risikogruppe 2 eingestuft) und 5 anderen hochinfektiösen *Y. pestis* Stämme überprüft. Die Experimente zur FTA-Karten Überprüfung haben die sichere Inaktivierung der Erreger gezeigt. Alle inaktivierten und immobilisierten Stämme zeigen kein Wachsturm nach 5-tägiger Kultivierung in flüssigem LB-Medium. Die Karten mit immobilisierter DNA lassen sich direkt in die PCR-Reaktion einsetzen.
Die FTA-Karten von der Firma Whatman / GE Healthscience wurden auch mit mehreren hochinfektiösen *Y. pestis* und *Francisella tularensis* Stämmen in Rostow-am-Don Antipest Institut, Russland, positiv bewertet.
„FTA-Karten“ erlauben die Archivierung von Nukleinsäuren von *Y. pestis* Proben bei Raumtemperatur (DNS ist stabil auf FTA-Karte mindestens für 15 Monate) und wurden für den direkten Einsatz in der PCR weiter geeignet.

**AP 5: Singleplex-PCR**

Für die erfolgreiche Behandlung lebensbedrohlich erkrankter Patienten ist die rechtzeitige, sichere Identifizierung des ursächlichen Erregers notwendig. *Y. pestis* – spezifische Genabschnitte wurden ausgewählt, die in der PCR amplifiziert werden

und eine eindeutige Zuordnung des Erregers erlauben. Wir haben *caf1, pla* und *lcrV* als PCR-Zielgene auf drei spezifischen *Y. pestis* Plasmiden, pFra, pYV und pPla, ausgewählt.

In Kooperation mit der chinesischen Arbeitsgruppe von Prof. R. Yang wurden zwei chromosomale Regionen identifiziert (YPO0387 – YPO0396 und YPO2084 - YPO2103)(Tabelle 2), die für den spezifische Nachweis von *Y. pestis* geeignet sind und in das zu etablierende Nachweisverfahren integriert werden sollen (5). Diese Regionen wurden bioinformatisch für eine mögliche Verwendung als *Y. pestis* spezifische diagnostische Marker analysiert und als spezifische Marker für die Pestdiagnostik in Kooperation mit TIB MOLBIOL entwickelt, um in ein Multiplex-PCR System integriert zu werden. Das zuerst ausgewählte chromosomales Zielgen YPO0392 hat in Singleplex PCR eine große Unspezifität gezeigt. Auch das bioinformatisch ausgewählte YPO2091 zeigt hohe Homologie (mehr als 70 %) zur pathogenen *Escherichia coli*. Deswegen wurde YPO2088 als vierter *Y. pestis*-spezifische diagnostischer Marker ausgewählt.

***Tabelle 2:*** Yersinia pestis-hochspezifische YPO2084 - YPO2103 chromosomale Region.

| • Gene ID | Length (kbp) | Function |
|---|---|---|
| • YPO2084 | 3,246 | putative phage integrase |
| • YPO2087 | 261 | Putative phage excisionase |
| • **YPO2088** | 645 | Putative methyltransferase |
| • YPO2090 | 606 | Putative phage protein |
| • **YPO2091** | 390 | Antitermination protein |
| • YPO2093 | 564 | Putative phage protein |
| • YPO2097 | 321 | putative phage protein |
| • YPO2102 | 450 | hypothetical phage protein |
| • YPO2103 | 2,814 | putative phage terminase |

Wir haben die Sensitivität und Spezifität von ausgewählten Primern mit gereinigtem bakteriellem Yersinia DNS in Real-Time PCR getestet (Applied Biosystems Prism

7000 Cycler). Die *caf1* Gen-Sonde hat dabei sowohl eine hohe Sensitivität, als auch eine hohe Spezifität gezeigt.

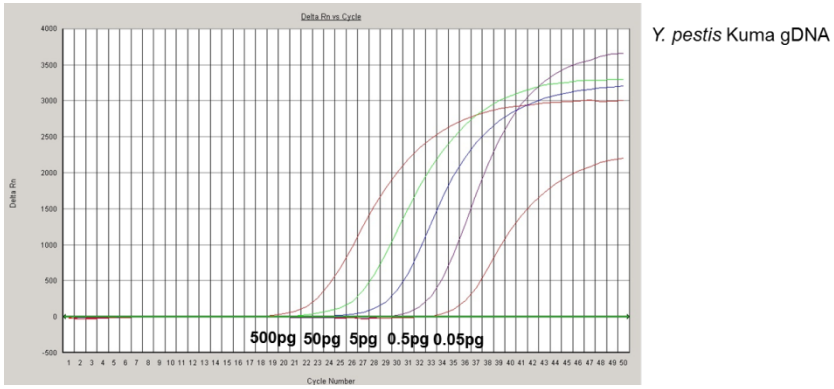



Abb.1. Serielle Verdünnung von *Y. pestis* Kuma gDNA – bis zu 50fg (0.05pg). Die Anwesenheit von caf1 Gen. Applied Biosystems Prism 7000 Cycler.

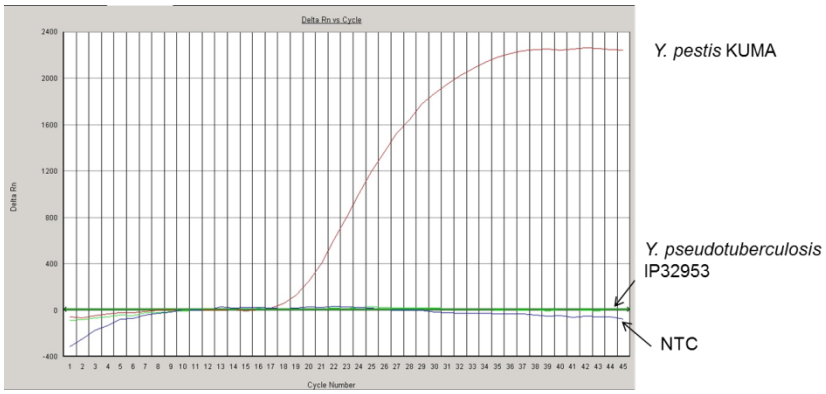
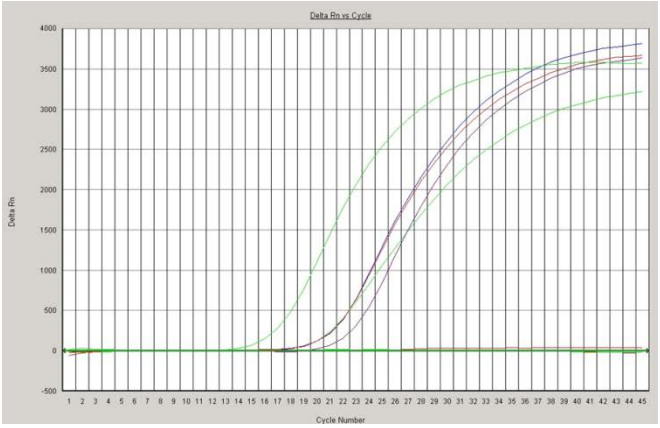



Abb.2. *Y. pestis* Kuma und *Y. pseudotuberculosis* IP32953 genomische DNS in Real-Time PCR mit caf1 Gen. Applied Biosystems Prism 7000 Cycler.

Bei *caf1* wurde die höchste Spezifität bei den *Y. pestis* Stämmen von den verschiedenen Genomvariationen (pFra, pYV, pPla Plasmide und pgm chromosomale Locus Verlust) und bei den *Y. pseudotuberculosis* Stämmen demonstriert.




**Positive samples**
- *Y. pestis* EV 76 gDNA
- *FTA Y. pestis* EV 76
- *FTA Y. pestis* EV 76 pYV-
- *FTA Y. pestis* EV 76 pPCP-
- *FTA Y. pestis* EV 76 pYV- pPCP-

**Negative samples**
- *Y. pseudotuberculosis* IP32953
- *Y. pseudotuberculosis* 488
- FTA *Y. pestis* 142R (caf1-)

Abb.3. Real-Time PCR mit *Yersinia* Stämmen mit verschiedenen Plasmiden.

Wir haben auch gezeigt, dass die Peressigsäure und das Serum einen verschiedenen Einfluss auf den Real Time PCR Lauf hat (Abb.).

DNA (pure) Triplicate

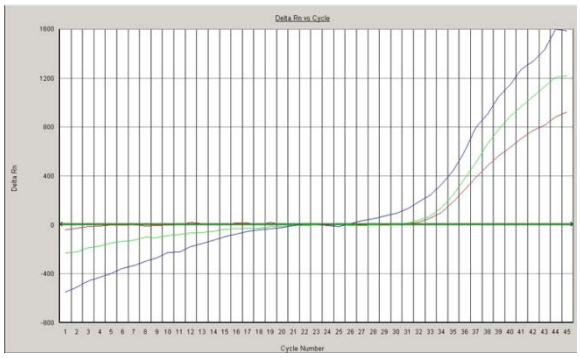



Abb.4. Real Time PCR von *Y. pestis* native DNS.

DNA (Serum) Triplicate

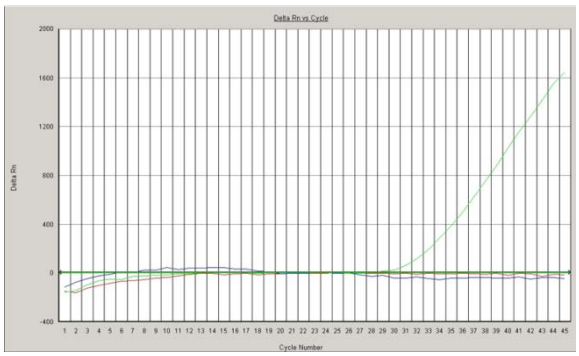



Abb.5. Real Time PCR von *Y. pestis* DNS in Serum.

Das Serum hat die Real Time PCR inhibiert.

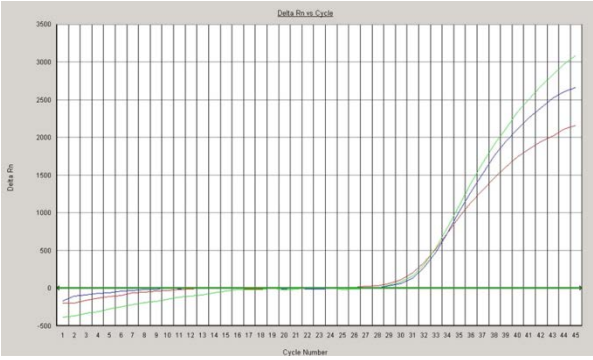



Abb.6. Real Time PCR von *Y. pestis* bakterielle Suspension in 0,03% Peressigsäure.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 0,03 % Peressigsäure *Y. pestis* inaktiviert, ohne die PCR negativ zu beeinflussen in Vergleich zu Serum, das die Real Time Reaktion inhibiert.

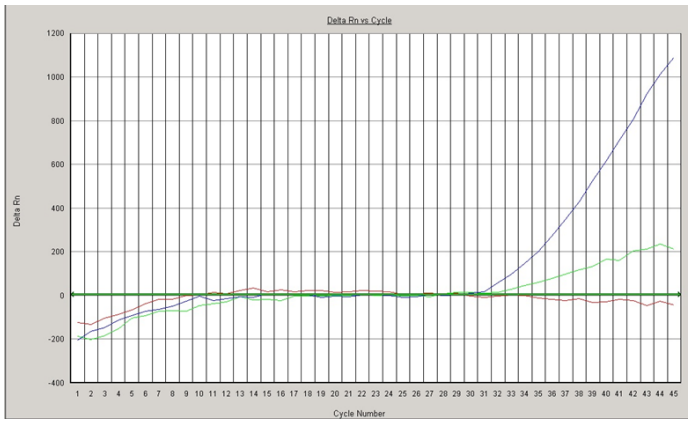



Abb.7. Real Time PCR von *Y. pestis* bakterielle Suspension in Peressigsäure und Serum.

Die weitere Validierung wurde in Kooperation mit dem IBM Kooperationspartner gemacht.

**AP 6: Multiplex PCR**

Die bisherigen, validierten Einzel-PCR Tests mit *Y. pestis*-spezifischen Plasmid-, chromosomalen- (und später Antibiotikaresistenz-Targets) wurden in die Multiplex-PCR integriert und anhand der MvP Institut *Yersinia*-Stammsammlung evaluiert.

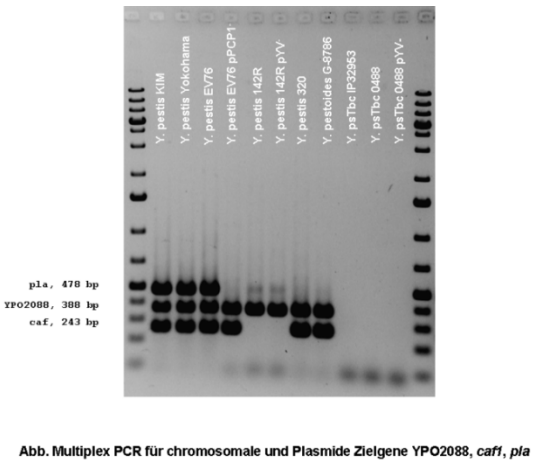



**Abb. Multiplex PCR für chromosomale und Plasmide Zielgene YPO2088, *caf1*, *pla***

Abb.8. Multiplex PCR für chromosomale und Plasmid Zielgene: YPO2088, *caf1* und *pla*.

Hier hat das MvPI eng mit der Firma TIB Molbiol zusammengearbeitet, die über große Expertise auf dem Gebiet des Primer- und Sondendesigns sowie der Herstellung von PCR-Mixen verfügt.

***Tabelle3.***

# *Y. pestis* – specifische Primer (in Kooperation mit TIB)

| | | |
|---|---|---|
| caf1 | AF053947S<br>AF053947A | CTA TAT GGA TTA TTG GTT AGA TAC GGT<br>GGT GAT CCC ATG TAC TTA ACA TTT |
| caf2 | YPcaf1F<br>YPcaf1R | TTG GTT AGA TAC GGT<br>CCC ATG TAC TTA ACA TTT |
| caf3 | YPcaf1S<br>YPcaf1A | TAC GGT TAC GGT TAC AGC AT<br>GGT GAT CCC ATG TAC TTA ACA |
| lcrV | YPlcrV-S2<br>YPlcrV-A | ATA TGA TCC CAG AAA AGA TTC GGA<br>CGC TTG ATG CCA TTT TGC A |
| pla1 | YpplaS1<br>YpplaAs1 | GCG CTC ATT CTG TTG TTT TGC<br>CGT TCC ATG TCT AAT TTG ACC TTC T |
| pla2 | YPpla-S<br>YPpla-R | GTA ATA GGT TAT AAC CAG CGC TT<br>AGA CTT TGG CAT TAG GTG TG |
| pla3 | YPpla_L<br>YPpla_b | TGC GGG TAA TAG GTT ATA ACC A<br>GCA TTT AAC TCA AAA TCA TTA ATG CGA |
| ypo1 | YPO2088F<br>YPO2088A | GGT ATC GAG TAG GGT TAG GTG GG<br>TTC AAC GCT TCA TTT TGT TGA CC |
| ypo2 | YPO2088S<br>YPO2088A | GAG TAG GGT TAG GTG GGC ATC A<br>TTC AAC GCT TCA TTT TGT TGA CC |
| ypo3 | YPO2088F<br>YPO2088R | GGT ATC GAG TAG GGT TAG GTG GG<br>GGC AAC AGC TCA ACA CCT TT |
| ypo4 | YPO2088R<br>YPO2088S | GAG TAG GGT TAG GTG GGC ATC A<br>GGC AAC AGC TCA ACA CCT TT |

Verschiedene Primer Kombinationen wurden bei uns in Multiplex PCR getestet.

Results for multiplex PCR analysis for various primer pairs combinations

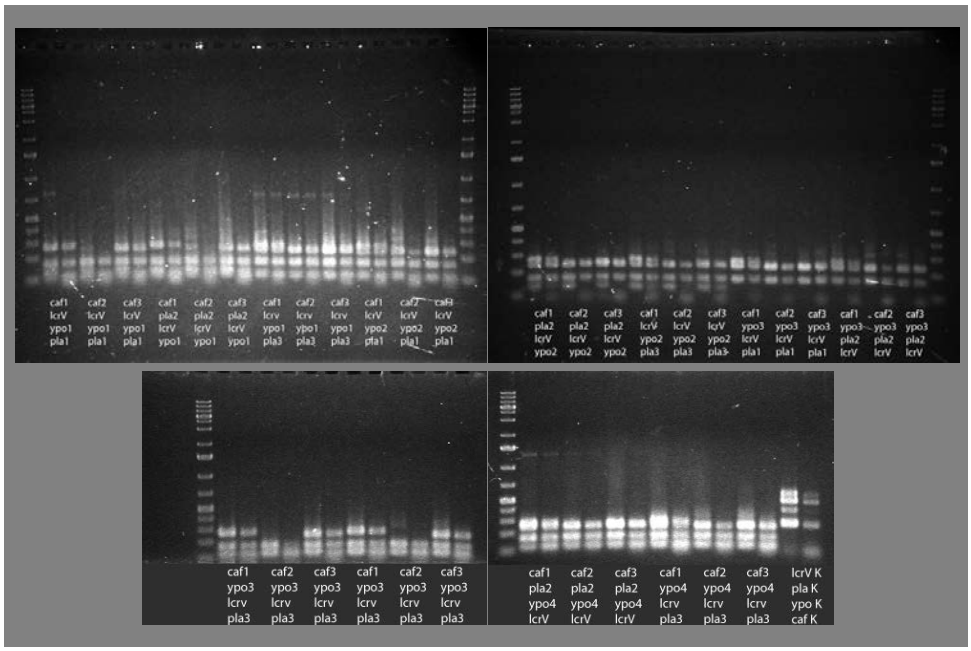



Abb.9. Verschiedene Primer-Kombinationen wurden in Multiplex PCR getestet.

Verschiedene Primer Kombinationen wurden bei uns in Multiplex PCR getestet und die besten Primer Kombinationen wurden ausgewählt:

- caf3+lcrV+pla1+ypo1
- caf1+lcrV+pla2+ypo1
- caf3+lcrV+pla2+ypo1
- caf1+lcrV+pla1+ypo2
- caf1+lcrV+pla3+ypo2

**AP 9: Resistenztestung mittels Real-time PCR**

Die primäre Pestpneumonie tritt innerhalb von 1-3 Tagen nach Inhalation von Bakterien akut und fulminant ein. Beginnt die Therapie bei Lungenpest erst mehr als

24 Stunden nach Auftreten der Symptome, sind die Überlebenschancen des Patienten gering (3, 8, 13). Da eine schnelle und wirksame Medikation entscheidend für einen günstigen Therapieverlauf ist, sollte vor der Wahl des Therapeutikums das Resistenzspektrum des Erregers bestimmt werden und molekulare Tests zur raschen Erkennung von Antibiotikaresistenzen beinhalten.

Chinolone, z.B. Ciprofloxacin, sind Antibiotika der ersten Wahl zur Behandlung von *Y. pestis* Infektionen (13). Ciprofloxacin wirkt auf die bakterielle DNA Gyrase und Topoisomerase IV. Die codierenden Gene dieser Enzyme enthalten sog. “hotspots”, die quionolone resistance-determining region (QRDR). Einzelne Basenpaaraustäusche innerhalb dieser Region erwirken eine Resistenz gegen das Antibiotikum und können für eine schnelle Detektion der Resistenz verwendet werden.

Die 12 Ciprofloxacin resistenten Mutanten (von 0,5 bis 5 µg/ml) wurden in *Y. pestis* EV76 konstruiert und mit der Multiplex PCR analysiert:

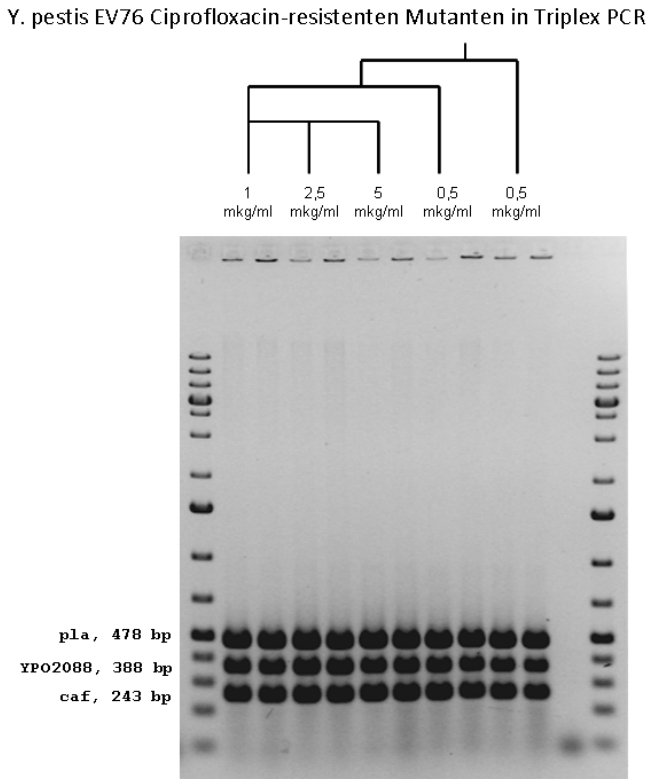



Abb.10. *Y. pestis* Ciprofloxacin-resistant Mutante in Triplex PCR mit *pla*, YPO2088 and *caf1* Primer.

Wie bereits beschrieben, steht auch vor der Etablierung der PCR-Protokolle für die Resistenzbestimmung eine eingehende Literaturrecherche und *in silico*-Analyse der Bakteriengenome. Damit sollen Marker identifiziert werden, die für die Diagnostik der Resistenzspektren der Erreger herangezogen werden können. Auch in diesem Arbeitspaket arbeitet das MvP eng mit der Firma TIB Molbiol zusammen.

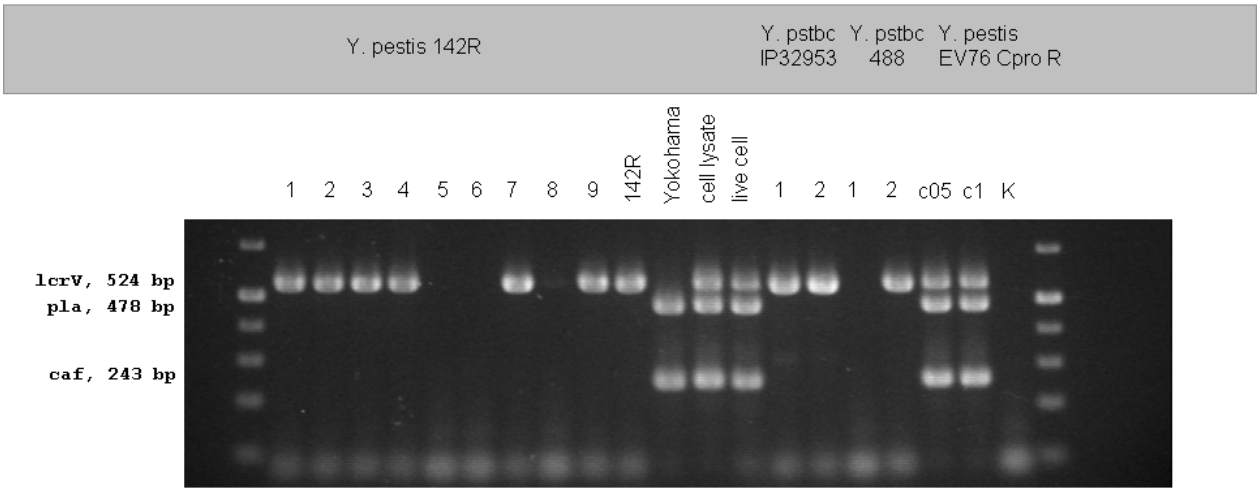



Abb. Multiplex PCR mit Y. pestis 142R, Y. pseudotuberculosis IP32953, 488 und Y. pestis EV76 Ciprofloxacin-resistent Stämme

Abb. 11. Multiplex PCR mit *lcrV*, *pla* und *caf1* Primer.

Die Nukleotidaustausche in der QRDR Region (10, 11) wurden bestimmt und die Marker für die Detektion der Resistenz werden konstruiert und evaluiert.

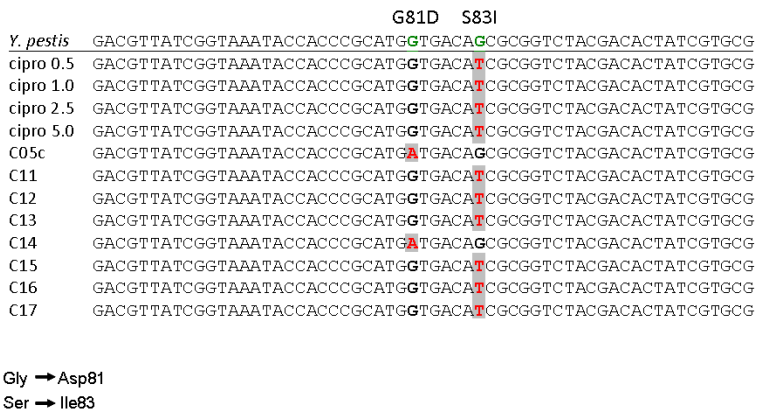



Abb. 12. Gyrase *gyrA* Gen Sequenzierung in Ciprofloxacin-resistenten *Y. pestis* EV76.

Real-Time PCR Primer für schnelle Detektion der Ciprofloxacin Resistenz in der QRDR Region in *Y. pestis* wurden bei der Fa. TIB MolBiol vorschlagen.

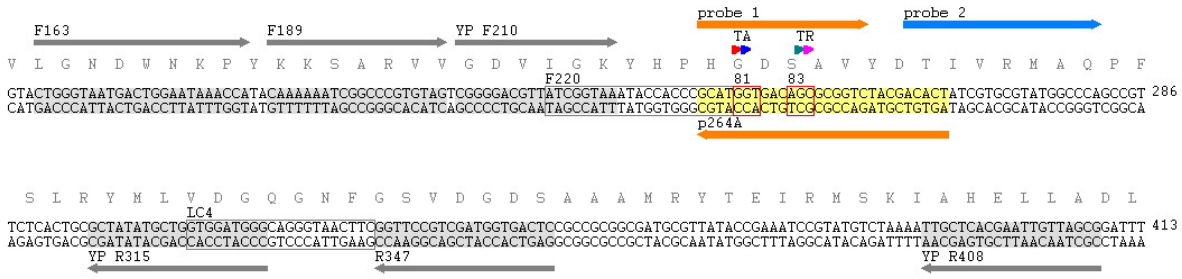



Abb.13. Real-time PCR Primers für schnelle Detektion der Ciprofloxacin Resistenz in *Y. pestis* (Fa. TIB MolBiol)

Wir haben den Plasmid-freien *Y. pestis* EVpl Stamm in Kooperation mit unserem russischem Kollegen in Rostow-am-Don konstruiert. Dieser Stamm besitzt keins der für *Y. pestis*-spezifischen Plasmide und hat nur einen Unterschied zu *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O1 Stämme. *Y. pestis* EVpl hat den YPO2088 Marker und unterscheidet sich von *Y. pseudotuberculosis* nur bei diesen Marker.

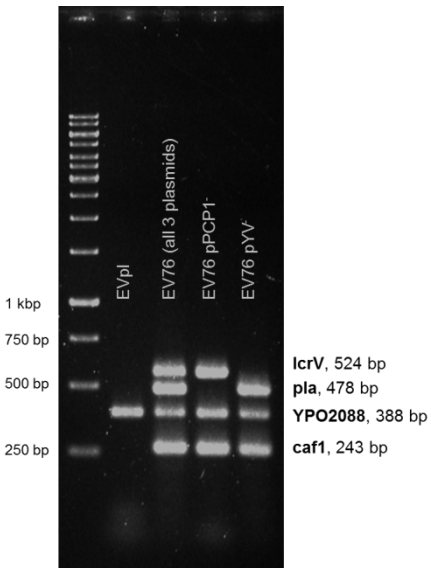



Abb.14. Multiplex PCR von Plasmid-frei *Y. pestis* EVpl Stamm mit *lcrV*, *pla*, *caf1* und YPO2088 Primer.

Es wurden *Y. pestis* EVpl Mutanten selektiert, die resistent zu 0,5 µg/ml Ciprofloxacin

waren. Wir haben drei neue Mutationsstellen in *Y. pestis* EVpl gyrA Gen gefunden. Dieser Hinweis ist für *gyrA* Primerdesign und Diagnostik sehr wichtig (11).

```
                                          G81D    S83I
                                          G81C    S83R          D87G
Native gyrA GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACAGCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
ci0.5       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
ci1.0       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
ci2.5       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
ci5.0       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C05c        GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGATGACAGCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C11         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C12         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C13         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C14         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGATGACAGCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C15         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C16         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
C17         GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACATCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
SmCi1       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATTGTGACAGCGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
SmCi2       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACAGAGCGGTCTACGACACTATCGTGCG
SmCi3       GACGTTATCGGTAAATACCACCCGCATGGTGACAGCGCGGTCTACGGCACTATCGTGCG
                                          G-T G-A   G-T C-A       A-G
```

Abb.15. *Y. pestis* EVpl Mutanten resistent zu 0,5 µg/ml Ciprofloxacin. Neue Mutationen sind in dem *gyrA* Gen zu definieren (in Rot).

Auch die Streptomycin resistenten Mutante (50 µg/ml) wurden in die Plasmid-freie *Y. pestis* EV76 selektiert und charakterisiert.

R86 ⟶ S86
G92 ⟶ S92

```
                    250         260         270         280
Yp rpsL wt  CTGATCCGTGGCGGTCGTGTTAAAGACTTGCCAGGTGTGCGTTAC
Yp rpsLmut  CTGATCCGTGGCGGTAGTGTTAAAGACTTGCCAAGTGTGCGTTAC
Native protein  L  I  R  G  G  R  V  K  D  L  P  G  V  R  Y
```

Abb.16. *Y. pestis* EVpl Mutanten resistent zu 50 µg/ml Streptomycin. *Y. pestis* EV76 Plasmid-freie $Sm^R$-Mutante hat zwei Austauschen im *rpsL* Gen.

**Zu AP 5,6,9. Erste Testergebnisse mit Prototyp EDDA Cycler Demonstrationsgerät von der Fa. FRIZ BioChem.**

Wir haben das EDDA Cycler Demonstrationsgerät und die Kartusche von unseren Kooperationspartner Fa. FRIZ BioChem bekommen (sehe Abb.) und getestet.

Abb.17. EDDA Cycler Demonstrationgerät von unseren Kooperationspartner Fa. FRIZ BioChem.

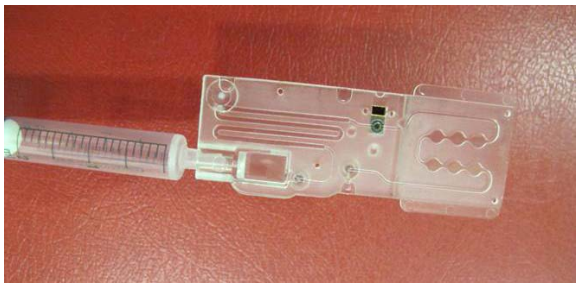


Abb.18. Die Kartusche zu EDDA Cycler Demonstrationgerät von Fa. FRIZ BioChem.

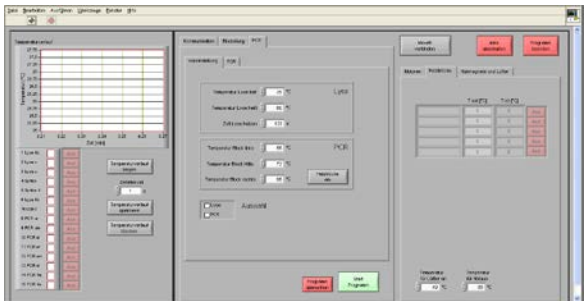


Abb.19. Die Computer Programm zu EDDA Cycler Demonstrationsgerät Analyse von Fa. FRIZ BioChem.

Die 5'-Ferrocen4 und 3'-Dithiol3 markierten Primer für Detektion von *caf1*, YPO2088 und Mutationen in *gyrA* Gen wurden in Kooperation mit der Fa. FRIZ BioChem konstruiert:

**für *caf*-Gen:**

```
Sig_YPcaf1        Fer - CCTgCTgCAAgTTTACCgCCTTTggA T
                                                        '71.0°C,
                                                         no Selfpriming
SS_YPcaf1         tCCAAAGGCGGTAAACTTGCAGCAGG ATTTTATTTTT

Primers are the same: (nested F-Primer)

F_caf-AF053947S    CTATATggATTATTggTTAgATACggT              '61.1
F_caf-YPcaf1S      ------------ ---------TACggTTACggTTACAgCAT
                                                             '61.7
R_caf-AF053947A    ggTgATCCCATgTACTTAACATTT                 '61.7
```

**für YP02088 - Gen:**

```
Sig_ypo2088       Fer - TCCATTTCATggCggTAATATCgggAtga T
SS_ypo2088        tcaTCCCGATATTACCGCCATGAAATGGA ATTATTTTTTT

Old primers have too high melting temperature:  (nested F-Primer)

F_YPO2088F        ggTATCgAgTAgggTTAggTggg            '65.2°C
F_YPO2088S        ------gAgTAgggTTAggTgggCATCA       '65.6°C
R_YPO2088A        TTCAACgCTTCATTTTgTTgACC            '63.3°C

New primers:
F_YPO2088F-short       ggTATCgAgTAgggTTAggTg              '61.2°C
F_YPO2088S-short       ----------AgggTTAggTgggCATCA       '63.2°C
R_YPO2088A-short       TTCAACgCTTCATTTTgTTgAC             '61.3°C
```

**für *gyrA* - Gen / Resistenzen:**

```
Old primer:
Sig_SP264A-TM          AgTgTCgTAgACCgCgCTgTCACCATgC
                       'Selfpriming is possible 35°C
                       74.0°C – too high/SNP-Mutationen 69.7-71.7)
                       WT-Sequence/ SNP mutations described as resistant


Sig_gyrA-SP263-AShort     Fer – gTgTCgTAgACCgCgCTgTCA AA
Sig_gyrA-SP255-AShort     Fer - gACCgCgCTgTCACCATgC AA
SS_gyrA-SP263-AShort      TGAcAGcGcGGTcTAcGAcAc ATTTTTTTTT
SS_gyrA-SP255-AShort      GcATGGTGAcAGcGcGGTc ATTTTTTTTT
'68.6°C 'No Secondary structures
```

```
F_gyrA-YP-F210-S        CggggACgTTATCggTAA                  '61.2°C
R_gyrA-YP-R315-A        CCCATCCACCAgCATATAgC                '62.6°C
```

Diese Primer, die in Kooperation mit der Fa. FRIZ BioChem konstruiert sind,wurden für alle *Yersinia* geeignet.

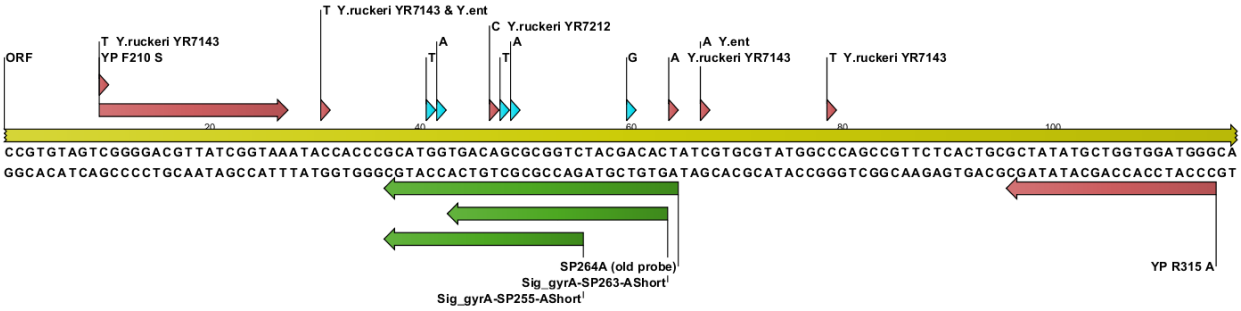



Abb.20. Primer, Sonde und SNP Stelle auf *gyrA*-Gen Sequenz. Die Primer sind für alle *Yersinia* geeignet.

Auch die alternative Primer selektiv für *Y. enterocolititca* und *Y. ruckeri* entwickelt wurden:

```
F-Primers sind 4 Basen länger:

F_gyrA-YP-F211 (Y.ruckeri)       ttGGGGACGTTATCGGTAAATAC    '60.5
F_gyrA-YP-F210Long (Y.pest&Y.ent)       tCGGGGACGTTATCGGTAAATAC    '62.7

R_gyrA-YP-R279       taGGCCATACGCACGATA        '61.7 selective for Y.ruckeri
R_gyrA-YP-R281      tTGGGCCATACGCACG           '62.0 not selective for Y.ruckeri
```

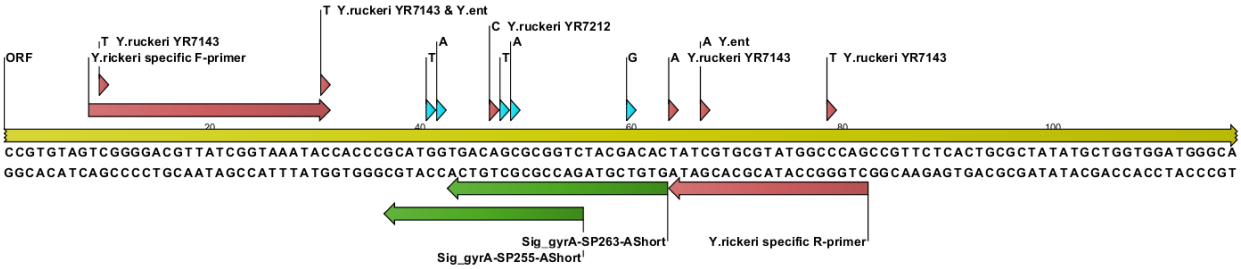



Abb.21. Die neue Primer Stelle war spezifisch für *Y. enterocolititca* und *Y. ruckeri*.

Die ersten Analysen wurden im sogenannten Competition Mode an asymmetrischen PCR-Targets gemacht. Hier befinden sich Signaloligos (10 nM) im PCR Ansatz. Werden Targets asymmetrisch gebildet, wird das in Lösung befindliche Signaloligo vom asymmetrischen Target abgefangen.

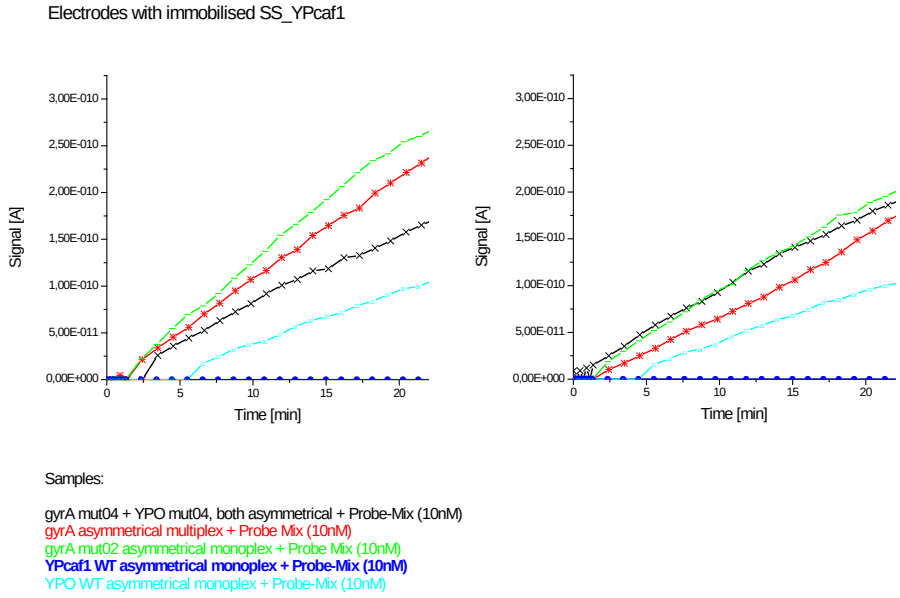



Abb.22. Hier sind die Teststellen für SS_Ypcaf1 dargestellt.

Hier sind Teststellen für SS_Ypcaf1 dargestellt. Es wurden (farblich gekennzeichnet) die verschiedenen PCR-Produkte getestet. Es befinden sich jeweils alle Signaloligos in Lösung. Wird Pcaf_1 gebildet schlägt die Sonde nicht an (dunkelblau), bei alle Produkten, die kein Ypcaf1 liefern, schlägt das Signaloligo an (schwarz, rot, grün, cyan).

***Ypcaf1 funktioniert.***

Elektrochemische Analyse der asymmetrischen PCR Produkte im EDDA Competition. Bei Abwesenheit des farblich indizierten Targets wird das in Lösung befindliche Signaloligo nicht gebunden. Es hybridisiert stattdessen am Chip mit der entsprechenden Sonde und führt zu einem relativ raschen Signalanstieg. Ist das asymmetrische Produkt vorhanden, werden signifikante Mengen des komplementären Signaloligos abgefangen und die verbleibenden freien Signaloligos führen zu einem verzögerten Signalanstieg bei reduzierter Hybridisierungseffizienz.

***Ypo2088 funktioniert auch.***

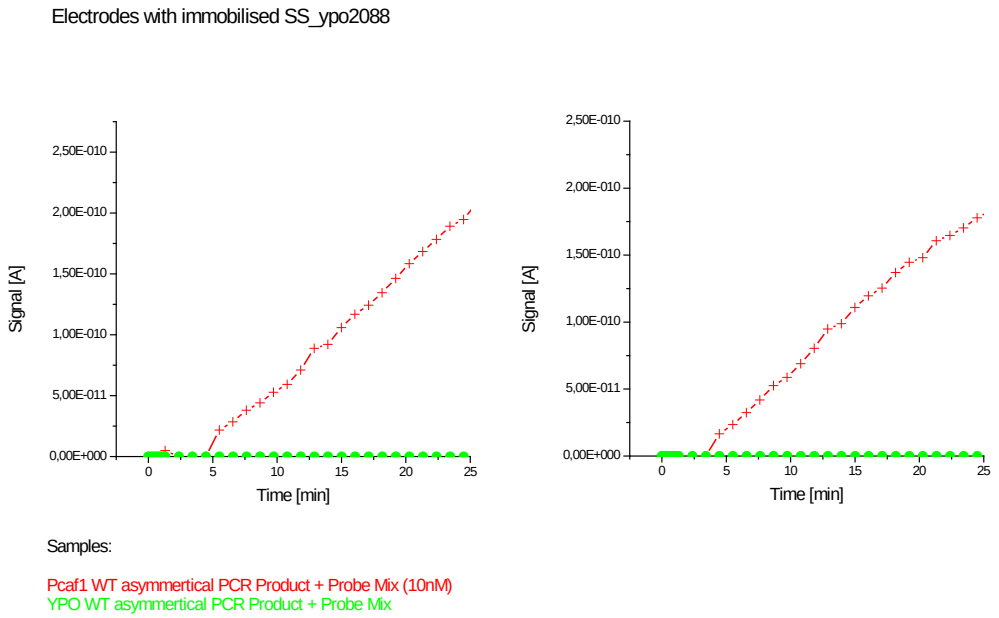
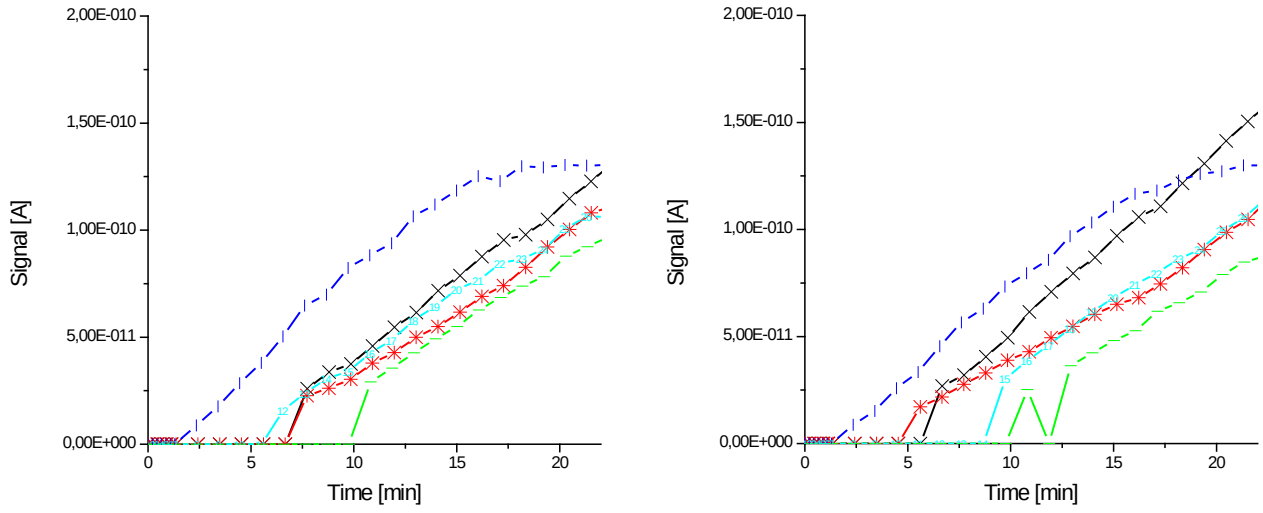



Abb.23. Hier sind die Teststellen für SS_ ypo2088 dargestellt.

Hier sind Teststellen für SS_ypo2088 dargestellt. Es wurden (farblich gekennzeichnet) nur zwei verschiedene PCR-Produkte getestet. Es befinden sich jeweils alle Signaloligos in Lösung. Wird Pcaf_1 gebildet schlägt die Sonde nicht an (grün), beim anderen Produkt Pcaf1, rot), schlägt das Signaloligo an.

Aber ***gyrA funktioniert noch nicht!***

Electrodes with immobilised SS_gyrA-SP255-AShort




Samples:

gyrA mut04 + YPO mut04, both asymmetrical + Probe-Mix (10nM)
gyrA asymmetrical multiplex + Probe Mix (10nM)
gyrA mut02 asymmetrical monoplex + Probe Mix (10nM)
YPcaf1 WT asymmetrical monoplex + Probe-Mix (10nM)
YPO WT asymmetrical monoplex + Probe-Mix (10nM)

Abb.24. Hier sind die Teststellen für SS_ gyrA-SP255-AShort dargestellt.

Wie die erste Abbildung, aber mit *gyrA*-Sonden. Das *gyrA* Signaloligo schlägt selbst bei *gyrA*-Produkt (grün/rot) an. Entweder ist die PCR nicht asymmetrisch oder das Signaloligo funktioniert nicht richtig.

Die ersten Ergebnisse mit dem EDDA Cycler Demonstrationgerät von Fa. FRIZ BioChem haben gezeigt, dass das Prototyp EDDA Cycler mit zwei Sonden, nämlich SS_Ypcaf1 und SS_ypo2088 funktioniert und *Y. pestis* DNS in Lösung detektiert.

LITERATUR


1. Austin Alchon, S. A pest in the land: new world epidemics in a global perspective. University of New Mexico Press. 2003: p. 2.
2. Bonacori SP, Scavizzi MR, Guiyoule A et al. Assessment of a fluoroquinolone, three betalactams, two aminoglycosides, and a tetracycline in treatment of murine Yersinia pestis infection. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38:481-486.
3. Butler, T. Plague and other Yersinia infections. 1983. Plenum Medical Book Company, New York, London.
4. Chu M. Laboratory manual of plague diagnostic. 2000. WHO, Geneva.
5. Cui Y, Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, Weinert LA, Wang Z, Guo Z, Xu L, Zhang Y, Zheng H, Qin N, Xiao X, Wu M, Wang X, Zhou D, Qi Z, Du Z, Wu H, Yang X, Cao H, Wang H, Wang J, Yao S, Rakin A, Li Y, Falush D, Balloux F, Achtman M, Song Y, Wang J, Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, Yersinia pestis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110 (2):577-82. doi: 10.1073/pnas.1205750110. Epub 2012 Dec 27
6. Devignat R. Varietes de l'espese Pasteurella pestis: nouvelle hyphotese. Bull WHO, 1951, 4:247-263.
7. Guiyoule A, Gerbaud G, Buchrieser C, Galimand M, Rahalison L, Chanteau S, Courvalin P, Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of Yersinia pestis. Emerg Infect Dis. 2001 Jan-Feb;7(1):43-8.
8. Harrison FJ. Prevention and control of plague. 1995. Aurora, Colo:US Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine. Technical Guide 103.
9. HeesemannJ, Rakin A. Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Pest. Antibiotikamonitor, 2002, 18:8-13.
10. Jacoby, G A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. Clinical Infectious Diseases 2005; 41:S120–6.
11. Luther E. Lindler, Wei Fan, and Nazma Jahan. Detection of Ciprofloxacin-Resistant *Yersinia pestis* by Fluorogenic PCR Using the LightCycler. J Clin Microbiol, 2001, 39 (10):3649-3655.
12. Martinevskij IL. Biology and genetic features of plague and plague-related microbes. 1969. Meditsina Press, Moscow.

13. Meyer KF. "Modern therapy of plague". *JAMA* 1950, **144** (12): 982–5.
14. Mwengee W, Butler T, Mgema S et al. "Treatment of plague with gentamicin or doxycycline in a randomized clinical trial in Tanzania". *Clin Infect Dis* 2006, **42** (5): 614–21.
15. G. Morelli, Y. Song, C.J. Mazzoni, M. Eppinger, P. Roumagnac, D.M. Wagner et al. "Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of Yersinia pestis". *Nature Genetics* 2010, **42** (12): 1140–3.
16. Neubauer H, Splettstösser W, Prior J et al. A comparison of different PCR assays for the rapid and presumptive diagnosis of Yersinia pestis. J Vet Med, Series B, 2000, 47:573-580.
17. Parkhill, J., B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. G. Holden, M. B. Prentice, M. Sebaihia et al. (2001). "Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague". *Nature* **413** (6855): 523–527.
18. Prentice MB, Rahalison L. "Plague". *Lancet* 2007, **369** (9568): 1196–207.
19. Rakin, A. Yersinia perstis - Eine Bedrohung für die Menschheit. Bundesgesundheitsbl, 2003, 49:949-955.
20. Russell P, Eley SM, Green M, Stagg AJ, Taylor RR, Nelson M, Beedham RJ, Bell DL, Rogers D, Whittington D, Titball RW. Efficacy of doxycycline and ciprofloxacin against experimental Yersinia pestis infection.J Antimicrob Chemother. 1998 Feb;41(2):301-5.
21. Welkos S et al. "Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague". *Vaccine* 2002, **20** (17–18): 2206–2214.
22. Worsham, PL, Roy, C. Pestoides F, a Yersinia pestis strain lacking plasminogen activator, is virulent by the aerosol route. Adv Exp Med Biol, 2003, 529: 129-131.