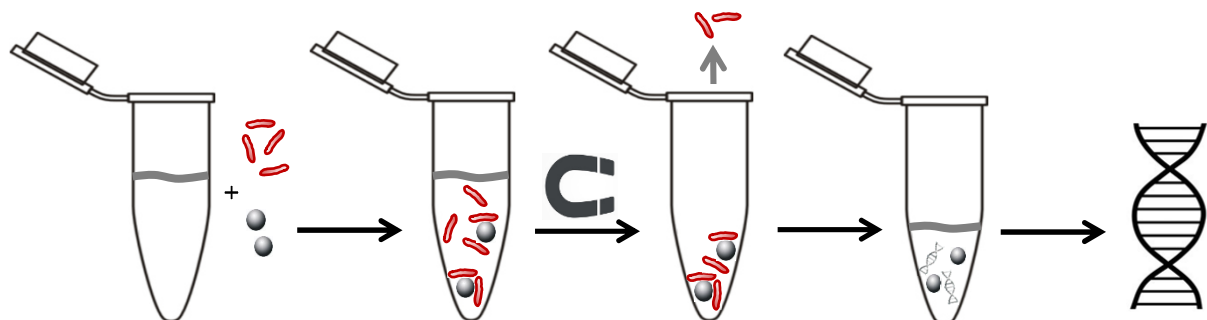


Verwendung von Lipobiotin-beschichteten magnetischen Beads zur Isolierung und Anreicherung von *M. tuberculosis*-Bakterien und deren DNA zum Nachweis aus Speichelproben



Medizinische Dissertation

Julia Hansen

Lübeck 2020

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:	Priv.-Doz. Dr. med. Christian Herzmann
2. Berichterstatter/Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Jan Rupp
Tag der mündlichen Prüfung:	21.09.2020
Druck genehmigt. Lübeck, den	21.09.2020
- Promotionskommission der Sektion Medizin -	

Doktorvater

PD Dr. med. Christian Herzmann

Klinisches Studienzentrum

Medizinische Klinik Borstel

Leibniz Lungenzentrum

Betreuer

PD Dr. Norbert Reiling

Mikrobielle Grenzflächenbiologie

Forschungszentrum Borstel

Leibniz Lungenzentrum

Ich danke dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) für die finanzielle
Unterstützung (grant TI07.003_Hansen_00 ; 08135MDJUH).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Julia Hansen, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Inhalt und Form dieser Arbeit sind eigenständig erarbeitet und verfasst worden. Die Arbeit entstand unter der Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Weder die gesamte Arbeit noch Teile davon habe ich an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Lübeck, den

.....

(Julia Hansen)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Tuberkulose – Platz 1 der infektiösen Todesursachen	8
1.2	Diagnostik	10
1.2.1	Immunologische Verfahren	10
1.2.2	Bildgebende Verfahren	11
1.2.3	Mykobakterielle Verfahren	12
1.2.3.1	Mikroskopie	12
1.2.3.2	Kultur	14
1.2.3.3	Nukleinsäureamplifikationsverfahren (NAT)	15
1.3	Probenmaterial	17
1.3.1	Sputum	17
1.3.2	Speichel	19
1.4	Optimierung der Diagnostik	19
1.5	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Reagenzien	22
2.2	Puffer und Medien	24
2.3	Biologische Assays	24
2.4	Funktionalisierung der magnetischen PEG-Beads	25
2.5	Adhäsionsassay mit Mykobakterien und den funktionalisierten PEG-Beads	26
2.6	Hitzeinaktivierung von Mtb Bakterien	27
2.7	Ethanol-DNA-Fällung	27
2.8	Messung mykobakterieller DNA mittels quantitativer Echt-Zeit PCR	27
2.9	Kolonie formende Einheiten (CFU) nach Adhäsionsassay in PBS	28
2.10	Fluoreszenz-Zytometrie nach Adhäsionsassay in PBS	28
2.11	Interaktion freier Mtb-DNA mit funktionalisierten LB-Beads und nicht funktionalisierten Beads	29
2.12	Mehrmalige Inkubation und Variation der Anzahl der LB-Beads	29
2.13	Rheologie der Speichelproben nach Proteinase K- und DTT-Behandlung	30

2.14	Einfluss von DTT und Proteinase K auf Mtb und die orale Begleitflora_____	30
2.15	Assay mit Mtb-versetzten Speichelproben _____	30
2.16	Einfluss von Penicillin G und Amphotericin B auf Mtb und die Begleitflora_____	31
2.17	CFU nach Adhäsionsassay in Speichel _____	31
2.18	Verblindete Testung von Patientenproben _____	31
2.19	Statistische Analyse _____	32
3	Ergebnisse _____	33
3.1	Bindung von Mtb an magnetische Beads _____	33
3.1.1	CFU nach Adhäsionsassay in PBS _____	33
3.1.2	Fluoreszenz-Zytometrie nach Adhäsionsassay in PBS _____	36
3.1.3	Quantitative Echtzeit PCR Inkubation der Beads mit Mtb in PBS _____	38
3.2	Adhäsionsassay in Puffern _____	40
3.2.1	Optimierung des Adhäsionsassays _____	40
3.2.1.1	Bindungsverhalten freier Mtb-DNA an Beads _____	40
3.2.1.2	Analyse der Proben mit magnetischen Beads in der PCR _____	42
3.2.1.3	Einfluss von Salzen auf die Interaktion von DNA und LB-Beads _____	44
3.2.1.4	Einfluss von pH-Werten auf die Interaktion von DNA und LB-Beads _	46
3.2.2	Ethanol-fällung der DNA _____	49
3.2.3	Variation der Inkubationszeit _____	51
3.2.4	Mehrmalige Inkubation und Variation der Anzahl der LB-Beads _____	52
3.3	Adhäsionsassay in Speichelproben _____	55
3.3.1	Adhäsionsassay in mit Mtb versetzten Speichelproben_____	55
3.3.1.1	Verminderung der Viskosität von Speichelproben _____	55
3.3.1.2	Rheologie der Speichelproben nach Proteinase K- und DTT-Behandlung _____	56
3.3.1.3	Einfluss von Proteinase K und DTT auf Mtb und Begleitflora _____	58
3.3.2	Assay in Speichelproben nach Zugabe von Mtb _____	61
3.3.3	CFU Analyse des Assays in mit Mtb versetzten Speichelproben _____	63
3.3.3.1	Wirkung von Amphotericin B und Penicillin G auf Mtb und orale Mundflora _____	63

3.3.3.2	Kolonie formende Einheiten (CFU) nach Adhäsionsassay in Speichel	65
3.3.4	Verblindete Testung von Patientenproben	67
4	Diskussion	72
4.1	Bindung von Bakterien und DNA durch LB-Beads	72
4.2	Testung des Verfahrens in Puffer und Speichelproben	75
4.3	Ausblick	80
4.4	Zusammenfassende Bemerkung	83
5	Zusammenfassung	84
6	Abstract	84
7	Anhang	ii
7.1	Abkürzungsverzeichnis	ii
7.2	Tabellenverzeichnis	iv
7.3	Abbildungsverzeichnis	v
7.4	Lebenslauf	vii
7.5	Ethikantrag	ix
7.6	Ethikvotum	xi
8	Danksagung	xiv
9	Quellen	xv

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose – Platz 1 der infektiösen Todesursachen

Tuberkulose (Tb) ist eine bakterielle Infektionskrankheit. Schon 1882 entdeckte Robert Koch den Erreger *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)¹. Seither wurden auch andere Bakterien entdeckt, die ebenfalls zu einer Erkrankung führen, die als *Mycobacterium tuberculosis-Komplex* (MTBC) zusammengefasst wurden². Mtb stellt jedoch mit 97% der Infektionen den häufigsten Erreger dar³. Die Erkrankung befällt in 85% der Fälle die Lunge (pulmonale Tb), was eine aerogene Übertragung, z.B. durch Husten, ermöglicht. Das Krankheitsbild der Tuberkulose kann sich auch in vielen anderen Organsystemen manifestieren (extrapulmonale Tb), wie beispielsweise dem Gastrointestinaltrakt, der Haut oder den Meningen. Weltweit liegt Tb auf Platz zehn der häufigsten Todesursachen und unter infektiösen Todesursachen sogar auf Platz eins⁴. Somit fordert Tb jährlich mehr Todesopfer als HIV und Malaria⁵. Im Jahr 2017 erkrankten global 10 Millionen Personen, die sich auf 5,8 Millionen Männer, 3,2 Millionen Frauen und 1 Million Kinder aufteilten⁴. Gleichzeitig starben im Jahr 2017 etwa 1,3 Millionen Menschen an den Folgen der Tb⁴. Dabei führen nicht alle Infektionen zu einem Ausbruch von Symptomen. Nur 5-15% der Infizierten entwickeln Symptome (aktive Tb)⁵, während bei 85-90% das Immunsystem den Erreger kontrollieren kann und es zu keiner klinischen Manifestation kommt (latente Tb). Die latente Form der Tuberkulose kann in die aktive Form übergehen, beispielsweise wenn das Immunsystem durch Medikamente oder andere Erkrankungen geschwächt ist.

In Deutschland wurden im Jahr 2017 insgesamt 5.486 Tuberkulosefälle diagnostiziert⁴. Seit 2015 zeigte sich eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit. Diese Zunahme ist durch das gesetzlich vorgeschriebene Tb-Screening von Asylbewerbenden und Flüchtlingen mittels aktiver Fallfindung zu erklären⁶. Unter aktiver Fallfindung versteht man Erstdiagnosen, die nicht aufgrund von Symptomen gestellt wurden. Hierzu gehören beispielsweise Screenings, Umgebungsuntersuchungen und die Überwachung von Kontaktpersonen⁶. 80% der diagnostizierten Tuberkulosen wurden in diesem Rahmen entdeckt.

„Trotz des Anstiegs der Tuberkulose-Fallzahlen ist das Infektionsrisiko innerhalb der Allgemeinbevölkerung unverändert sehr gering“, so Lothar H. Wieler, Präsident der Robert Koch-Instituts⁷. Die Letalität lag 2017 bei 1,9%, was insgesamt 102 Todesfällen entspricht. Damit ist die Letalität im Vergleich zum Vorjahr sogar gesunken⁸.

Seit den frühen 1990er Jahren ist es global gelungen, die Mortalität um 47% zu senken. Auch die Inzidenz ist seit 2000 um 18% gesunken⁹. Hierfür sind verschiedene Programme von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ins Leben gerufen worden. Das im Jahr 2015 zuletzt veröffentlichte Programm „The END TB Strategy“ hat das Ziel die Mortalität bis 2035 um 95% und die Inzidenz um 90% im Vergleich zu den Zahlen des Jahres 2015 zu senken¹⁰. Um dies umsetzen zu können, müssen laut der WHO neue diagnostische

Methoden, neue Medikamente für eine effektive Behandlung und Impfungen entwickelt werden⁵.

Jährlich erkranken weltweit 1 Million Kinder an Tb, was ca. 10% aller Tuberkulosefälle entspricht⁴. In den meisten Fällen sind Kinder unter fünf Jahren betroffen⁵. Die Besonderheiten der kindlichen Tuberkulose liegen zum einen darin, dass sich Symptome üblicherweise im ersten Jahr nach der Infektion entwickeln⁵. Im Erwachsenenalter entwickeln nur 5-10% der latent Infizierten eine aktive Tuberkulose, davon die Hälfte in den ersten zwei bis drei Jahren nach der Infektion¹¹. Zum anderen liegt eine Besonderheit der kindlichen Tb in der klinischen Manifestation. So sind erkrankte Kinder besonders gefährdet durch eine disseminierte Tuberkulose, wie zum Beispiel die Miliartuberkulose, oder die tuberkulöse Meningitis¹². Darüber hinaus unterliegt die Erkrankung im Kindesalter auch bei immunkompetenten Kindern einer raschen Progression. Erkrankt ein immunsupprimiertes Kind, so ist die Progression noch ausgeprägter¹³. Werden die Kinder älter, so ähnelt die Klinik zunehmend der der Erwachsenen¹⁴.

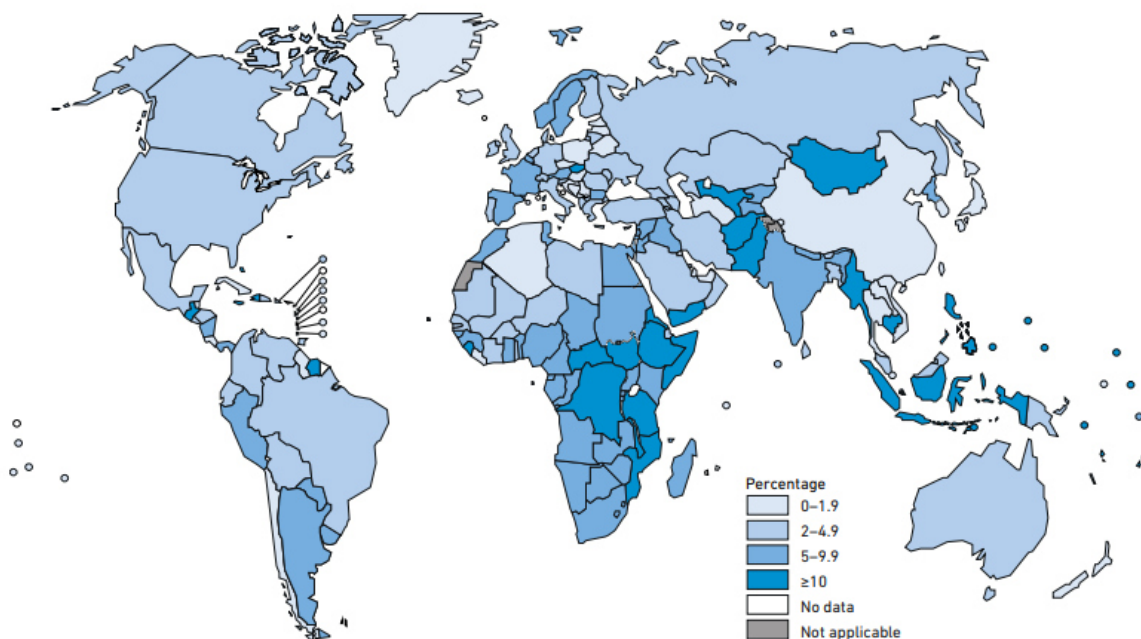


Abbildung 1: Prozent der neuinfizierten und reaktivierten Tuberkulosefälle von Kindern (Alter <15 Jahre) in 2017. Quelle: Global Tb-report, WHO, 2018.

Damit stellt die Tuberkulose nicht nur ein höheres Risiko für Kinder dar, sondern ist durch die zeitnahe Manifestation ein wesentlicher prognostischer Faktor, um zu beurteilen, wie sich die Infektionsrate in einer Population verändern wird. Es ist also zielführend, durch diagnostische Methoden ein möglichst genaues Bild von den pädiatrischen Infektionsraten zu erhalten. Jedoch gibt es einige Probleme bei der Diagnostik kindlicher Tb. Kinder entwickeln häufig keine oder unspezifische Symptome¹⁵. Des Weiteren ist es schwierig für

Kleinkinder, Sputum zu generieren, welches für die heutige Diagnostik der pulmonalen Tb einen wichtigen Baustein darstellt¹⁶.

1.2 Diagnostik

1.2.1 Immunologische Verfahren

Um zu untersuchen, ob ein/e Patient/-in jemals Kontakt zu Mtb hatte, werden immunologische Tests genutzt. Es gibt den Tuberkulin-Hauttest (THT) und den Interferon- γ -Release-Assay (IGRA). Tuberkulin ist eine nicht klar definierte Mischung verschiedener Proteine, die aus einer Mtb-Kultur gewonnen wird und beim THT intrakutan appliziert wird¹⁷. Nach 72 Stunden kann der Test an der Injektionsstelle abgelesen und ausgewertet werden. Dies erfolgt in Abhängigkeit der Induration, die sich aufgrund der Immunreaktion ausbildet. Bei einer Induration ≥ 10 mm gilt der Test als positiv. Da der THT nicht spezifisch für *Mycobacterium tuberculosis* ist, kann durch eine Impfung mit *Mycobacterium bovis* *Bacille-Calmette-Guérin* (BCG) das Testergebnis falsch positiv beeinflusst werden¹⁸. Auch eine Infektion mit nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM) kann zu einem positiven Testergebnis führen. Falsch negative Ergebnisse können beim THT nach der Masernimpfung auftreten, da es nach der Immunisierung zu einer temporären Suppression der zellvermittelten Immunantwort kommt¹⁹. Eine Testung sollte daher vor der Immunisierung bzw. mit einem 4- bis 6-wöchigem Abstand erfolgen¹⁹. Allgemein vermindert eine Immunsuppression aus verschiedenen Gründen die Aussagekraft dieses Tests.

Seit 2005 steht neben dem THT der Interferon- γ Release Assay (IGRA) zur Verfügung, der den THT aus der klinischen Anwendung in Deutschland weitgehend verdrängt hat. Bei diesem Verfahren wird die Interferon- γ -Ausschüttung nach Zugabe von Mtb-spezifischen Antigenen gemessen. Falls der/die Patient/-in zuvor Kontakt zu Mtb hatte, produzieren die T-Lymphozyten dieses Zytokin^{20,21}. Im Gegensatz zum THT unterscheidet der IGRA zwischen einem Kontakt zu Mtb und der BCG-Impfung²². Das Testergebnis bleibt bei den meisten Infektionen mit NTM negativ, außer nach Kontakt mit *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. flavescens* und *M. gastrii*²². Aufgrund dieser Vorteile wird der IGRA zur initialen Testung von Erwachsenen empfohlen. Auch bei älteren Kindern kann der Test angewendet werden. Für Kinder unter fünf Jahren ist die Datenlage für eine Aussage allerdings noch unzureichend²².

1.2.2 Bildgebende Verfahren



Abbildung 2: Röntgenaufnahme des Thorax im p.a.-Strahlengang.

Rechtsthorakal sind scharf abgrenzbare Veränderungen zu erkennen, bei denen es sich um kavernöse Veränderungen handelt, die im Verlauf einer postprimären Tuberkulose entstehen können. Quelle: Klinisches Studienzentrum, Forschungszentrum Borstel.



Abbildung 3: CT-Aufnahme im Transversalschnitt. Kavernöse Veränderung im linken Lungenflügel. Quelle: Klinisches Studienzentrum, Forschungszentrum Borstel.

Um den Verdacht einer aktiven pulmonalen Tuberkulose zu überprüfen, sollte eine Bildgebung der Lunge angefertigt werden. Initial erfolgt dies durch eine Röntgenthoraxaufnahme. Im Röntgen kann sich eine aktive Tb in jedem Lungenlappen darstellen. Bei erwachsenen Patienten/-innen sind zumeist die Oberlappen betroffen²³, wobei eine multilobuläre Manifestation bis zu zwei Drittel der Fälle auftritt²⁴. Im Verlauf kann es durch Destruktion und Fibrosierung des Lungengewebes zu Kavernen und Bronchiektasen kommen²⁵. Bei Kindern besitzt die Röntgenthoraxaufnahme eine geringere Sensitivität²⁶. Zumeist ist nur eine hiliäre Lymphadenopathie zu erkennen. Der Befall peripheren Lungengewebes und die Ausbildung von Kavernen ist selten der Fall²⁶.

Die Computertomographie (CT) besitzt, bezogen auf die Lymphadenopathie und Kavernen, eine höhere Sensitivität²⁷. Mittels CT konnte bei 58% der Patienten/-innen mit aktiver Tb Kavernen identifiziert werden. Mittels Röntgen waren es lediglich 30-50%²⁸. Auch bei extrapulmonaler oder abdominaler Tb wird das CT bevorzugt genutzt²⁸. Für spezielle Fragestellungen, wie bei der Infiltration von Nerven- oder Knochengewebe, kann die Magnetresonanztomographie (MRT) genutzt werden²⁹ und auch die 2-(18F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose-Positronenemissionstomographie (¹⁸F-FDG PET) kann bei Patienten/-innen mit dem *Humanen Immundefizienz-Virus* (HIV) oder Immunsupprimierten Anwendung finden^{30,31}.

Sind in der Bildgebung Veränderungen erkennbar, spricht dies für eine aktive Erkrankung oder eine abgeheilte Tb. Zeichen, die für eine aktive Form sprechen, sind zentrilobuläre Infiltrate, dickwandige Kavernen, Pleuraergüsse, nekrotisch einschmelzende Lymphknoten²⁴. Bei einer latenten Tb sind keine Veränderungen in der Bildgebung erkennbar.

1.2.3 Mykobakterielle Verfahren

Um eine aktive Erkrankung an Tuberkulose und eine Infektiosität der Erkrankten nachzuweisen, muss ein Erregernachweis erfolgen. Der Nachweis kann je nach Krankheitsbild aus verschiedenen Patientenmaterialien und mittels Mikroskopie, Kultur oder molekularbiologischen Methoden erfolgen. Für die Diagnose einer pulmonalen Tb wird in der Regel Sputum, Bronchial- oder Trachealsekret verwendet. Es ist jedoch auch möglich, Mykobakterien im Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Pleuraerguss und in Gewebeproben zu identifizieren³².

1.2.3.1 Mikroskopie

Die Mikroskopie von Sputumproben gehört, besonders in Ländern mit hoher Prävalenz, zum Standard der Diagnostik^{33,34}. Sie kann mittels einer Ziehl-Neelsen-Färbung (ZN-Färbung) oder einer Auramin-Rhodamin-Färbung durchgeführt werden. Bei der ZN-Färbung werden zunächst alle Bakterien unter Hitze mit dem Farbstoff „Fuchsin“ rot gefärbt. Anschließend erfolgt eine

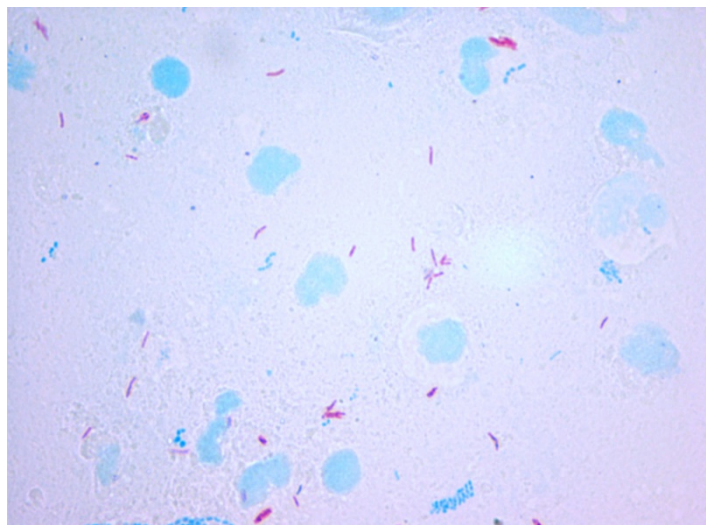


Abbildung 4: Ziehl-Neelsen-Färbung einer Probe eines Tuberkulose-Patienten/-in.

M. tuberculosis sind rot angefärbt. Quelle: NRZ Borstel.

säurefesten Stäbchen, zu denen auch die Mykobakterien gehören, entfärben sich nicht mehr und behalten den roten Farbstoff bei. Sie können anschließend unter dem Lichtmikroskop identifiziert werden. Die Auramin-Rhodamin-Färbung basiert auf dem gleichen Prinzip. Durch eine Kombination aus Auramin O und Rhodamin B werden zunächst alle Zellwände angefärbt. Nach einer Entfärbung wird mit Kaliumpermanganat gegengefärbt. In den Zellwänden der Mykobakterien bleibt die ursprüngliche Auramin-Rhodamin-Färbung erhalten³⁵. Die fluoreszierenden Mykobakterien können anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

Da diese Färbeweise zu den Kaltfärbungen gehört, wird sie oft als technisch einfacher und schneller als die ZN-Färbung beschrieben³⁶. Darüber hinaus zeigt sie nach Kommareddi et al. eine höhere Sensitivität und einen niedrigeren negativen prädiktiven Wert, obwohl sie eine geringere Spezifität als die ZN-Färbung aufweist³⁶. Daher wird sie heutzutage bevorzugt und von der Weltgesundheitsorganisation empfohlen.

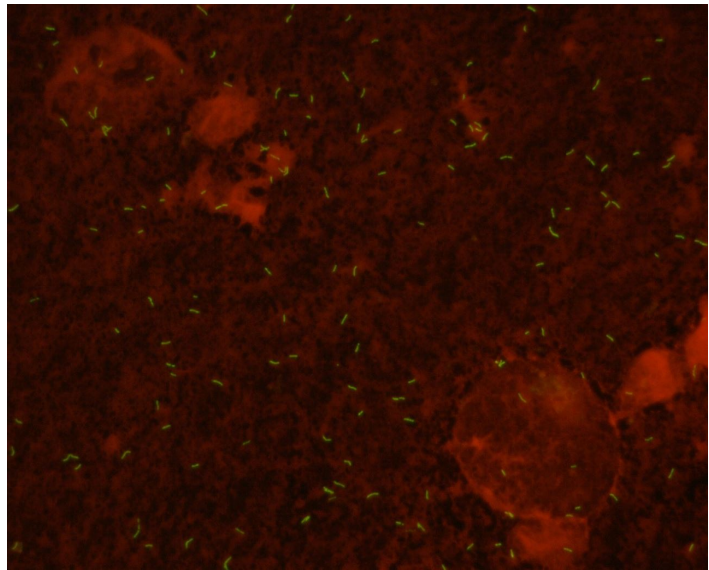


Abbildung 5: Auramin-Rhodamin-Färbung.

M. tuberculosis sind grün angefärbt. Quelle: NRZ Borstel.

Der Vorteil beider Färbemethoden ist der schnelle Nachweis von säurefesten Stäbchen. Innerhalb eines Tages kann ein Ergebnis ermittelt werden³⁷. Allerdings sind etwa $10^3 - 10^4$ Keime pro ml Probenmaterial nötig, um diese in der Mikroskopie zu identifizieren¹¹, da geringere Bakterienkonzentrationen zu falsch-negativen Ergebnissen führen³⁸. Auch eine geringe Menge von Sputum und eine unsachgemäße Prozessierung der Proben sind Gründe für falsch-negative Ergebnisse³⁹. Insgesamt können bei beiden Färbeverfahren nur weniger als zwei Drittel der Erkrankten identifiziert werden⁴⁰. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und durch die Therapie abgetöteten Bakterien, kann nicht unternommen werden. Dies ist durch einen kulturellen Nachweis möglich. Auch die mikroskopische Differenzierung von Mtb und anderen Mykobakterien ist unter dem Mikroskop nicht möglich¹¹. Hierzu müssten zusätzlich Nukleinsäureamplifikationsverfahren durchgeführt werden.

1.2.3.2 Kultur

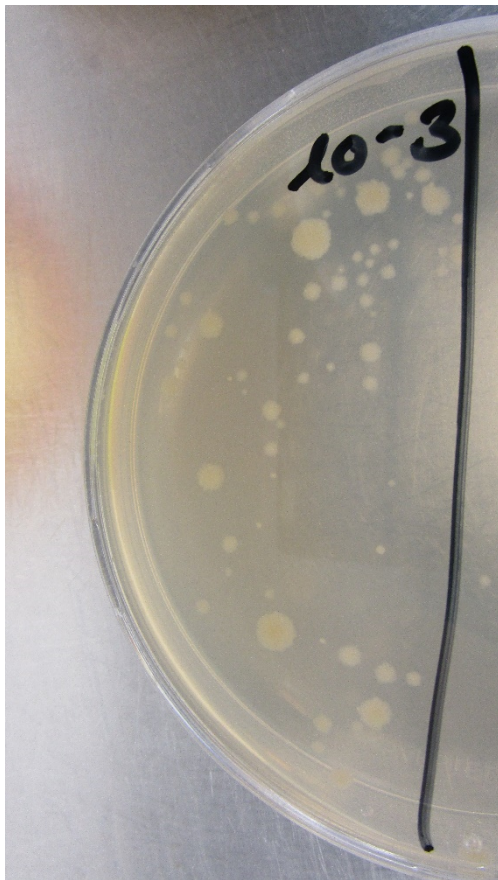


Abbildung 6: Kulturen von *M. tuberculosis* auf Agar.

Quelle: Forschungszentrum Borstel.

Aufgrund der schlechten Sensitivität und Spezifität der Mikroskopie wird die Diagnostik durch kulturelle Anzüchtung ergänzt. In 22-61% der Mikroskopie-negativen Fälle, kann so eine Tb festgestellt werden⁴¹.

Kulturen können aus unterschiedlichen Patientenmaterialien angelegt werden. Als Standard für eine pulmonale Tuberkulose werden Sputumproben verwendet, welche zunächst einer Behandlung mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH unterzogen werden⁴², um andere Bakterien, die ebenfalls im Sputum vorhanden sind, abzutöten. Aufgrund der langen Generationszeit von Mtb, die etwa 15 bis 20 Stunden beträgt⁴³, würde es ohne eine solche Vorbehandlung zu einer Überwachsung von Mtb durch andere, schneller wachsende Keime kommen. Nachteilig sterben auch einige Mykobakterien bei dieser Behandlung ab. Die Zahl variiert je nach genutztem Verfahren und den einzelnen Spezies stark. Anschließend werden die Proben auf verschiedenen Medien

ausgebracht. Zur Verfügung stehen Flüssigmedien, wie das MGIT 960 und Festmedien, wie Löwenstein-Jensen, Stonebrink und Middlebrook 7H10⁴². Alle Medien werden bei 37°C für sechs bis acht Wochen inkubiert¹¹. Tortolio et al. konnten zeigen, dass das MGIT-Verfahren genauso gute Ergebnisse erzielen konnte wie ein kultureller Nachweis auf Löwenstein-Jensen-Medien. Gleichzeitig konnte in den Flüssigmedien schon mehr als zehn Tage früher als in den Festmedien Mtb nachgewiesen werden⁴⁴. Nichtsdestotrotz wird der Nachweis in Kombination von Flüssig- und Festmedien empfohlen, um die Sensitivität zu erhöhen⁴⁵. Der so durchgeführte kulturelle Nachweis ist hierzulande der Goldstandard. Die Sensitivität und Spezifität sind verglichen mit anderen diagnostischen Methoden am größten⁴⁶. Allerdings dauert der Nachweis mehrere Wochen.

1.2.3.3 Nukleinsäureamplifikationsverfahren (NAT)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) können Nukleinsäuren in Probenmaterialien amplifiziert und analysiert werden. Durch dieses Verfahren kann eine pulmonale Tuberkulose mit einer sehr hohen Sensitivität von 98% diagnostiziert werden^{47,48}. Da in der PCR zusätzlich unterschieden werden kann, ob es sich um Mtb oder andere nontuberkulöse Mykobakterien handelt und schnelle Resistenztestungen möglich sind, werden NAT von der WHO als Erstdiagnostik empfohlen⁴⁹.

Jedoch sollten NAT nicht alleine zur Diagnose genutzt werden. Das Robert Koch-Institut empfiehlt eine Kombination dieser Technik mit einem kulturellen Nachweis¹¹. Gleichzeitig warnt es davor, die PCR als Therapiekontrolle zu nutzen. Auch die DNA bereits abgetöteter Bakterien kann in der PCR detektiert werden und gibt daher keinen Aufschluss über den Erfolg der eingeleiteten Therapie. Diese Methode kann nicht nur zur Unterscheidung verschiedener Spezies genutzt werden. Auch Analysen bezüglich Medikamentenresistenzen sind möglich^{50–52}. Aufgrund des Resistenzmusters wird zwischen sensibler Tb, Rifampicin-resistenter Tb (RR-Tb), multiresistenter Tb (MDR-Tb) und extensiv resistenter Tb (XDR-Tb) unterschieden. Dabei weist eine MDR-Tb zusätzlich zur Rifampicin-Resistenz der RR-Tb eine weitere Resistenz gegen Isoniazid auf. Eine XDR-Tb zeichnet sich durch zusätzliche Resistenzen gegen Antibiotika der Gruppe der Fluorchinolone und einem der injizierbaren Zweitangmedikamenten (Amikacin, Capreomycin oder Kanamycin) aus. Im Jahr 2017 waren 14% der in Deutschland diagnostizierten Tb-Fälle entweder eine RR-Tb, MDR-Tb oder XDR-Tb⁸. Eine Therapie ist mit zunehmenden Resistenzen schwieriger, da weniger wirksame Medikamente zur Verfügung stehen. Der Therapieerfolg bei XDR-Patienten/-innen lag 2015 bei nur bei 33%⁴. Mit einem NAT ist es möglich, Mtb auf zahlreiche Resistenzen zu untersuchen und innerhalb kürzester Zeit einen Therapieplan erstellen. Diese frühere und gezielte Behandlung könnte den Therapieerfolg begünstigen.

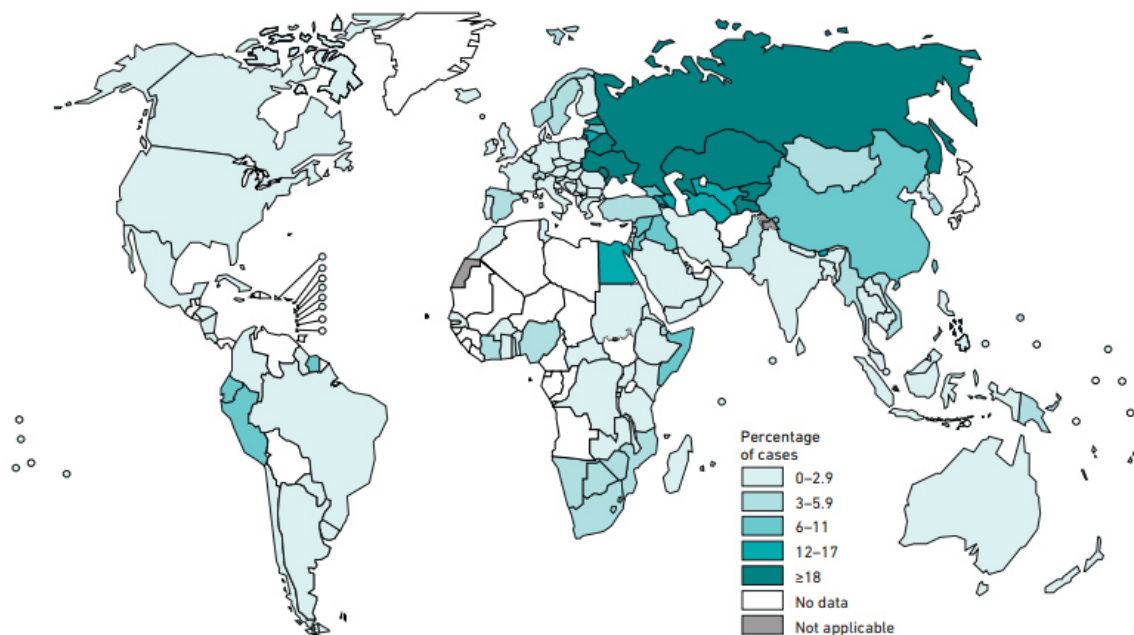


Abbildung 7: Prozentzahl der neu diagnostizierten Tb-Erkrankungen mit MDR/RR-Tb in 2017. Quelle: Global Tb-report, WHO, 2018.

Seit 2010 wird der GeneXpert MTB/RIF von der WHO empfohlen. Er ist in der Lage, aus Sputumproben innerhalb von zwei Stunden einen Nachweis von Mtb durchzuführen und den vorliegenden Stamm gleichzeitig auf eine Rifampicin-Resistenz zu testen⁵³. Hierfür wird das Gen der RNA-Polymerase beta (rpoB) analysiert⁵⁴. Durch die vollautomatisierte Prozessierung benötigt der GeneXpert einen geringen Personalaufwand und reduziert damit anwenderbezogene Fehler⁵⁵. Insgesamt erreicht der GeneXpert den Nachweis von Mtb betreffend eine Sensitivität von 89% mit einer Spezifität von 99%. Die Rifampicin-Resistenz kann mit einer 95 % Sensitivität und einer 98-prozentigen Spezifität nachgewiesen werden⁵⁶. Damit ist diese Methode sensitiver als die Mikroskopie und liefert in kurzer Zeit einen Nachweis von Mtb sowie eine erste Resistenzbestimmung, die sehr wichtig für die initiale Therapie ist⁵³. Dennoch wird empfohlen, diese Methode in Kombination mit dem kulturellen Nachweis durchzuführen, um alle Erkrankten sicher detektieren zu können⁵⁶. Ob eine Untersuchung mit dem GeneXpert kostenintensiver ist, als die herkömmlichen diagnostischen Verfahren, ist umstritten⁵³⁻⁵⁵. Hohe Kosten stellen besonders in Entwicklungsländern ein Problem dar.

Es ist wichtig, die bestehenden mikrobiellen Diagnosemethoden in Kombination zu nutzen, um eine schnelle, sichere und gleichzeitig umfassende Diagnostik zu gewährleisten.

1.3 Probenmaterial

1.3.1 Sputum

Das Standardmaterial für den Nachweis einer pulmonalen Tb ist Sputum. Allerdings ist es nicht allen Erkrankten möglich, Sputumproben zu generieren, denn etwa 30% aller Betroffenen sind nicht in der Lage, Sputum auszuhusten⁵⁷. Besonders Kinder, geistig beeinträchtigte Menschen oder stark geschwächte Patienten/-innen sind nicht in der Lage, ausreichend Material für eine Analyse abzuhusten. Kinder neigen dazu, das abgehustete Sputum zu verschlucken, anstatt es auszuspucken⁵⁸. Doch nicht nur die Gewinnung der Proben ist ein Problem, auch andere Gründe können die auf Sputumproben basierende Diagnostik erschweren. Ein supprimiertes Immunsystem oder fortgeschrittene HIV-Erkrankung führen zu falsch-negativen Ergebnissen, ebenso wie niedrige Bakterienkonzentrationen im Material, schlechte Probenqualität oder eine unsachgemäße Präparation der Proben³⁹. Daher sind verschiedene ergänzende Ansätze entwickelt worden, um die Diagnostik zu verbessern. Es können eine Sputuminduktion, eine broncheoalveoläre Lavage oder eine transbronchiale Biopsie durchgeführt werden⁵⁹.

Die Sputuminduktion wurde zuerst 1969 von Hensler et al. zur Diagnostik von aktiver pulmonaler Tb beschrieben⁶⁰. Bei diesem Verfahren inhaliert der/die Patient/-in für 10-20 Minuten eine 3-5%ige Kochsalz-, Salbutamol- oder Glucose-Lösung⁶¹⁻⁶³. Durch die Inhalation gelangen osmotisch wirksame Lösungen in die tieferen Atemwege, wo interstitielle Flüssigkeit in die Atemwege übertritt. Des Weiteren führt auch die Irritation der Schleimhäute zu einer vermehrten Sekretion⁶². Wiederholtes Husten führt anschließend zum Auswurf des Sekrets⁶². Durch diese Methode kann das Volumen von Sputumproben erhöht und die Detektion Mtb verbessert werden⁶⁴⁻⁶⁶. In der direkten Mikroskopie lassen sich nach der Induktion in 42% bis 96% der zuvor negativen Proben säurefeste Stäbchen nachweisen⁶⁴⁻⁶⁶.

Eine andere Möglichkeit, die Sensitivität der Diagnostik zu verbessern, ist die Durchführung einer broncheoalveolären Lavage (BAL). Sie kann dann angeschlossen werden, wenn ein begründeter Verdacht besteht, die Mikroskopie und die Nukleinsäureamplifikationsverfahren allerdings negativ sind⁴⁰. Im Rahmen einer Bronchoskopie wird 100-300 ml sterile, ungepufferte, isotone Kochsalzlösung (0,9% NaCl) in die betroffenen Lungenabschnitte instilliert und anschließend wieder abgesaugt⁶⁷. Das so gewonnene Material kann anschließend zytologisch oder mikrobiologisch untersucht werden.

Der Vorteil einer BAL ist, dass nicht nur Tb diagnostiziert, sondern auch andere Differentialdiagnosen überprüft werden können, wie beispielsweise eine Aspergillose oder ein Lungenkarzinom. Dies kann durch eine zusätzliche Biopsie erfolgen. Außerdem kann durch die Untersuchung des gewonnenen Materials sogar eine Unterscheidung, Anhand

vorliegender Mtb spezifischer T-Zelle, zwischen aktiver und latenter Tuberkulose getroffen werden⁶⁸. Altaf Bachh et al. kommen zu dem Schluss, dass mit einer BAL exzellentes Material gewonnen werden kann, um eine pulmonale Tuberkulose nachzuweisen⁶⁹.

Allerdings erfolgt die BAL in vielen Ländern Kurznarkose und ist damit risikobehaftet, zeit- und kostenaufwändig, was die Anwendung in ärmeren Ländern stark limitiert. In verschiedenen Studien wurde überprüft, ob eine BAL die Detektion von Mtb verglichen mit Sputumproben erhöht. Je nach Studie konnte aus der BAL mittels mikrobiologischer Verfahren zwischen 25% und 78,5% häufiger eine Tb diagnostiziert werden verglichen mit normalen Sputumproben^{65,70–72}. Der Erfolg einer BAL ist von vielen Faktoren abhängig, wie der Bereitschaft der Erkrankten, der Expertise des/der Arztes/Ärztin oder der Menge der eingesetzten Flüssigkeit⁶⁵.

Damit sind sowohl die Sputuminduktion als auch die BAL eine Möglichkeit, die Sensitivität des Nachweises von Mtb aus Sputumproben zu erhöhen. Die Sputuminduktion sollte allerdings der BAL vorgezogen werden, da sie weniger zeit- und kostenintensiv und weniger invasiv ist. Darüber hinaus wird sie von den Patienten/-innen besser toleriert und das Risiko einer nosokomialen Transmission ist geringer. Sollte die Sputuminduktion zu keinem Nachweis führen, kann bei begründetem Verdacht überlegt werden, eine BAL anzuschließen⁶⁵.

Ein symptom-basiertes Screening ist bei Kindern und Jugendlichen nicht sinnvoll, da die Krankheit oft wenige Beschwerden verursacht⁷³. Immunologische Tests weisen eine ungenügende Sensitivität von 60% – 80% auf. Besonders oft treten nicht eindeutig auswertbare oder negative IGRA-Ergebnisse bei jungen Kindern auf^{74,75}. Auch die bildgebenden Verfahren sind bei Kindern nur bedingt einsatzfähig und aussagekräftig. Bei Kindern unter zwei Jahren mit kulturell gesicherter Tb-Diagnose lag in einer Studie nur in 28% der Fälle ein pathologischer Befund des Röntgenthorax vor⁷⁶. Darüber hinaus ist ein restriktiver Umgang mit ionisierender Strahlung im Kindesalter besonders wichtig. Auch mikrobielle Untersuchungen sind bei Kindern und Jugendlichen limitiert. Die mikrobielle Untersuchung von Sputumproben ist im Kindesalter nur begrenzt einsetzbar. Sputuminduktion und BAL können auch bei Kindern durchgeführt werden. Allerdings haben diese Verfahren einige Nachteile. So benötigt die Sputuminduktion Vorbereitungszeit, und die BAL ist zeit- und kostenintensiv. Da jüngere Kinder dazu neigen, Sputum nicht auszuspucken, sondern es zu verschlucken, besteht eine weitere diagnostische Alternative darin, Magensaft zu analysieren. Dieser wird mithilfe einer Magensonde gewonnen und anschließend mikrobiologisch untersucht, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben^{63,77–79}. Einige Studien belegen, dass die diagnostische Qualität mit denen der Sputuminduktion zu vergleichen sind⁸⁰, andere bewerten die Sputuminduktion als aussagekräftiger⁸¹. Allerdings gibt es bei der Gewinnung und Untersuchung des Magensaftes eine geringere

Ansteckungsgefahr, da kein Husten induziert und somit weniger infektiöse Aerosole gebildet werden⁸¹.

1.3.2 Speichel

Da sowohl Sputum als auch Magensaft einige Nachteile in der pädiatrischen Diagnostik aufweisen, muss über eine andere Möglichkeit nachgedacht werden Mtb nachzuweisen. Die Bakterien befinden sich primär in der Lunge, können durch Husten allerdings in die Mundhöhle gelangen und anschließend im Magensaft nachgewiesen werden. Da sie die Mundhöhle passieren, könnte auch Speichel ein geeignetes Material zur Diagnostik darstellen, der leichter verfügbar ist. Speichel kann bei Kindern jeden Alters gewonnen werden, entweder in Form von Speichelproben, Kaugummis, Wattetupfern oder Schnullern. Keines der Verfahren ist invasiv oder risikoreich.

Bereits 1909 zeigten Neillid et al., dass die Detektion von Mykobakterien aus Speichel mit einer ZN-Färbung möglich ist. Dennoch kamen sie zu dem Schluss, dass Speichel kein geeignetes Material darstellt, da die Bakterienkonzentration im Speichel nur 0,1-1% der Bakterienkonzentration im Sputum beträgt^{82,83}. In einigen anderen Studien konnte anschließend gezeigt werden, dass bei einer Färbung von Speichel mit der Auramin-Rhodamin-Methode eine bessere Sensitivität erreicht werden konnte, verglichen mit der ZN-Färbung. Die Schlussfolgerung, die aus diesen Experimenten abgeleitet werden konnte, war, dass Speichel somit eine gute Alternative darstellt, wenn kein Sputum generiert werden kann^{84,85}. Mtb konnte nicht nur mikroskopisch aus Speichel nachgewiesen werden, auch der Nachweis unter Verwendung der PCR war möglich⁸⁶.

1.4 Optimierung der Diagnostik

Allerdings bleiben die niedrigen Bakterienzahlen im Speichel ein Problem⁸⁷. Mit abnehmender Bakterienzahl sinkt auch die Sensitivität der diagnostischen Methoden. Für eine aussagekräftige ZN-Färbung sind $10^3 - 10^4$ Keime pro ml notwendig. Dementsprechend wäre eine Methode sinnvoll, bei der die Bakterien aus dem Speichel angereichert werden können. Zudem verbleiben nach Speichelabgabe viele Erreger in der Mundhöhle, da Mykobakterien an Zähnen und dem Zahnfleisch haften⁸⁸. Eine Anreicherung könnte beispielsweise mit einer Art Kaugummi erfolgen. Wäre diese kaubare Matrix in der Lage, Mykobakterien aus dem Speichel zu binden, diese von den Zähnen abzulösen und ebenfalls zu binden, könnte die Anzahl der gewonnenen Bakterien erhöht werden. Dies könnte in der nachgeschalteten Analyse des Kaugummis zu einer verbesserten Detektionsrate von Mtb führen und die Verwendung von Speichel als Probenmaterial möglich machen.

Hierfür ist es essenziell, zunächst einen Liganden zu identifizieren, der in der Lage ist, Mtb zu binden. Dieser Ligand könnte an eine Kaugummimatrix gebunden werden und hieran

Mtb anreichern. Für verschiedene Peptide, Proteine und Antikörper konnte gezeigt werden, dass Mtb spezifisch von dem jeweiligen Liganden gebunden wird^{89–95}. Auch Dr. Katharina Kolbe ist es 2016 im Rahmen ihrer Dissertation am Forschungszentrum Borstel gelungen, zwei Lipidliganden zu identifizieren, die Mtb effektiv aus einer Lösung binden können⁹⁶.

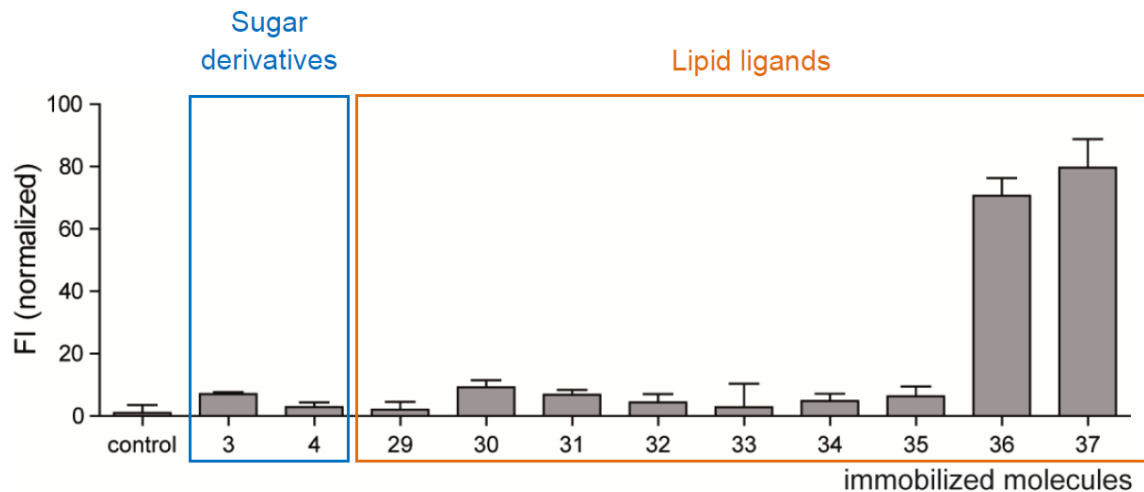


Abbildung 8: Bindung von Mtb H37Rv an funktionalisierte magnetische Beads⁹⁶. Unfunktionalisierte Beads (control) und mit verschiedenen Liganden funktionalisierte Beads (3-37) wurden mit GFP-exprimierenden Mtb inkubiert. Gebundene Bakterien wurden mittels Fluoreszenzanalyse untersucht. Die Fluoreszenzintensität (FI) wurde mit einer gemessenen Intensität von 125 000 normalisiert. Drei unabhängige Experimente. Ligand 36 ist Lipobiotin. Quelle: Dissertation Dr. Katharina Kolbe, 2016.

Diese Liganden wurden an Mikrotiterplatten und magnetische Beads gekoppelt, was in Vorexperimenten ermöglichte Mtb aus Flüssigkeiten zu binden und zu extrahieren. Einer der vielversprechenden Liganden ist Lipobiotin (vgl. Abbildung 8; Nr. 36), dessen Interaktion mit der mykobakteriellen Zellwand schon seit 2013 beschrieben wurde⁹⁷.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel meiner Arbeit ist es, basierend auf den Ergebnissen von Dr. Katharina Kolbe, einen Adhäsions-Assay zu entwickeln, der es ermöglicht, Mtb aus Flüssigkeiten (Pufferlösungen und humanem Speichel) zu binden, anzureichern und deren DNA-Detektion mittels PCR zu ermöglichen⁹⁶. Langfristiges Ziel ist es, die Detektion von Mtb zu verbessern, um auch in Speichelproben von Tb-Patienten/-innen Mtb sicher nachzuweisen. Zusammenfassend sollen folgende Fragen adressiert werden:

1. Binden Lipobiotin-funktionalisierte Beads Mtb aus Flüssigkeiten?
2. Kann Mtb und Mtb-DNA aus Puffern an funktionalisierten Beads angereichert werden?
3. Kann Mtb und Mtb-DNA aus Speichel an funktionalisierten Beads angereichert werden?
4. Kann Mtb im Patientenspeichel nachgewiesen werden und verbessert der Einsatz funktionalisierter Beads diesen Nachweis?

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten in Zukunft dazu beitragen, Tuberkulose aus Speichelproben zu diagnostizieren. Als langfristige Perspektive dieses Projekts steht die Entwicklung eines diagnostischen Kaugummis, der Mtb aus der Mundhöhle bindet.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Tabelle 1: Genutzte Reagenzien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	VWR International, Radnor, USA
Ammoniumacetat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
COOH-Beads	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS (10x)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	VWR International, Radnor, USA
Ethanolamin	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., Tokyo, Japan
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Middlebrook 7H10 Agar	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PEG-COOH-Beads	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Deutschland
Penicillin G	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	VWR International, Radnor, USA
Ammoniumacetat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
COOH-Beads	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Germany
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS (10x)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ethanol	VWR International, Radnor, USA
Ethanolamin	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., Tokyo, Japan
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Middlebrook 7H10 Agar	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PEG-COOH-Beads	Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Germany
Penicillin G	Biochrom AG, Berlin, Germany
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Salzsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Sodium chloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium hydroxide	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2 Puffer und Medien

Die pH-Werte wurden mit HCl (100mM) oder NaOH (100mM) Lösungen adjustiert, wenn nicht anders beschrieben. Alle Puffer und Medien (vgl. Tabelle 2) wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Tabelle 2: Genutzte Puffer und Medien

Carbonat Puffer, pH 9,4	Natriumcarbonat (1,59g, 15,0mM) und Natriumhydrogencarbonat (2,52g, 30,0mM) wurden in bidestilliertem Wasser (1l) gelöst und anschließend auf den gewünschten pH-Wert titriert.
2-(N-morpholino)ethanesulfonic-acid(MES) Puffer, pH 6,3	MES (9,76g, 50,0mM) wurde in bidestilliertem Wasser (100ml) gelöst und anschließend auf den gewünschten pH-Wert titriert unter Gebrauch einer Natriumcarbonatlösung (2,5M).
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,0	Dulbecco's PBS (10x) wurde 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.
TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 9,0, pH 9,5, pH 10,0, pH 11,0	TRIS/HCl (1ml, 1M, pH 8,0) und EDTA (200µl, 0,5M) wurden in bidestilliertem Wasser (100ml) gelöst und anschließend auf den gewünschten pH-Wert titriert.
7H10 Medium (mit Penicillin G und Amphotericin B)	Middlebrook 7H10 Agar (19g) wurde in bidestilliertem Wasser (900 ml) gelöst. Anschließend wurde Glycerol (2,00ml, 27,4mM) hinzugefügt und die Flaschen autoklaviert. Fetales Rinderserum (100ml) und ggf. Amphotericin B (560µl/100ml Medium) und Penicillin G (10.000 IU/ml; 1ml/100ml Medium) wurden hinzugegeben, vermischt und in Platten gegossen.
Blutagar-Basis-Platten Nr. 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.3 Biologische Assays

Alle Bakterienstämme (vgl. Tabelle 3) wurden im Middlebrook 7H9 Medium mit „Oleic Albumin Dextrose Catalase“ (OADC, 10%), Tween 80 (0,05%) und Glycerol (0,2%) angezogen. In der exponentiellen Phase des Wachstums ($OD_{600} = 0,4$) wurden die Kulturen bei -80°C aliquotiert und eingefroren, wie zuvor beschrieben⁹⁸. Für die Nutzung

der Keime im Adhäsionsassay wurden die Aliquots (Mtb H37Rv: $2,6 \cdot 10^8$ Bakterien/ml) aufgetaut (37°C), zentrifugiert ($3629 \times g$, 4°C , 10min) und anschließend das Pellet in PBS resuspendiert. Die Konzentration wurde auf 10^8 Bakterien pro ml gebracht und anschließend mit einer sterilen 1 ml Spritze mit 26-Gauge Nadel homogenisiert.

Tabelle 3: Mykobakterienstämme

Name	Beschreibung	Source
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> Stamm H37Rv, ATCC 27294	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
GFP-exprimierendes <i>M. tuberculosis</i>	Der Stamm besitzt ein GFP-exprimierendes Plasmid (pMN::437) ⁹⁹ , abgeleitet von H37Rv (ATCC 27294)	Prof. Dr. M. Niederweis, University of Alabama at Birmingham, USA
Cherry 10-exprimierendes <i>M. tuberculosis</i>	Der Stamm besitzt mCherry exprimierendes Plasmid (pCherry10) ¹⁰⁰ , abgeleitet von H37Rv (ATCC 25618)	Prof. Dr. Ulrich Schaible, Forschungszentrum Borstel, Deutschland

2.4 Funktionalisierung der magnetischen PEG-Beads

Aus der funktionellen COOH-Gruppe der magnetischen Beads und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Lipobiotins entsteht eine Amidbindung unter der Abspaltung von H_2O . Nach diesem Prinzip können magnetische Beads mit Lipobiotin funktionalisiert werden. Beads (micromer-M, Polystyrol-Körper, Oberfläche: PEG-COOH, $5\mu\text{m}$, micromod; $800\mu\text{l}$, $5,6 \cdot 10^8$ Beads) wurden mit N-Hydroxysuccinimid (NHS; 12,8mg) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC 6,4mg) im MES-Puffer (pH 6,3; $200\mu\text{l}$) suspendiert und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und 60rpm auf dem Rollenmischer (Roller 6 Basic, Faust) inkubiert. Die so aktivierten Beads wurden zweimal mit PBS (1ml/Gefäß) gewaschen und anschließend in drei Portionen aufgeteilt ($1,87 \cdot 10^8$ Beads pro Gefäß). Im nächsten Schritt wurden die Beads mit Lipobiotin (1,5mg/ml in Carbonatpuffer, pH 9,2) bei Raumtemperatur und 60rpm auf dem Rollenmischer für 4,5 Stunden inkubiert. Die funktionalisierten Beads wurden erneut zweimal mit PBS (1ml/Gefäß) gewaschen und anschließend wurden die Beads mit Ethanolamin (10mM in Carbonatpuffer; pH 9,2; 1ml/Gefäß) inkubiert, um die unreaktierten Estergruppen abzublocken. Dies geschah bei einer Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur und 60rpm auf dem Rollenmischer. Die

Beads wurden zweimal mit PBS (1ml/Gefäß) gewaschen und in 1ml PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei +4°C im Kühlschrank. Alle Schritte wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen und unter Verwendung eines Magnetständers (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) ausgeführt.

2.5 Adhäsionsassay mit Mykobakterien und den funktionalisierten PEG-Beads

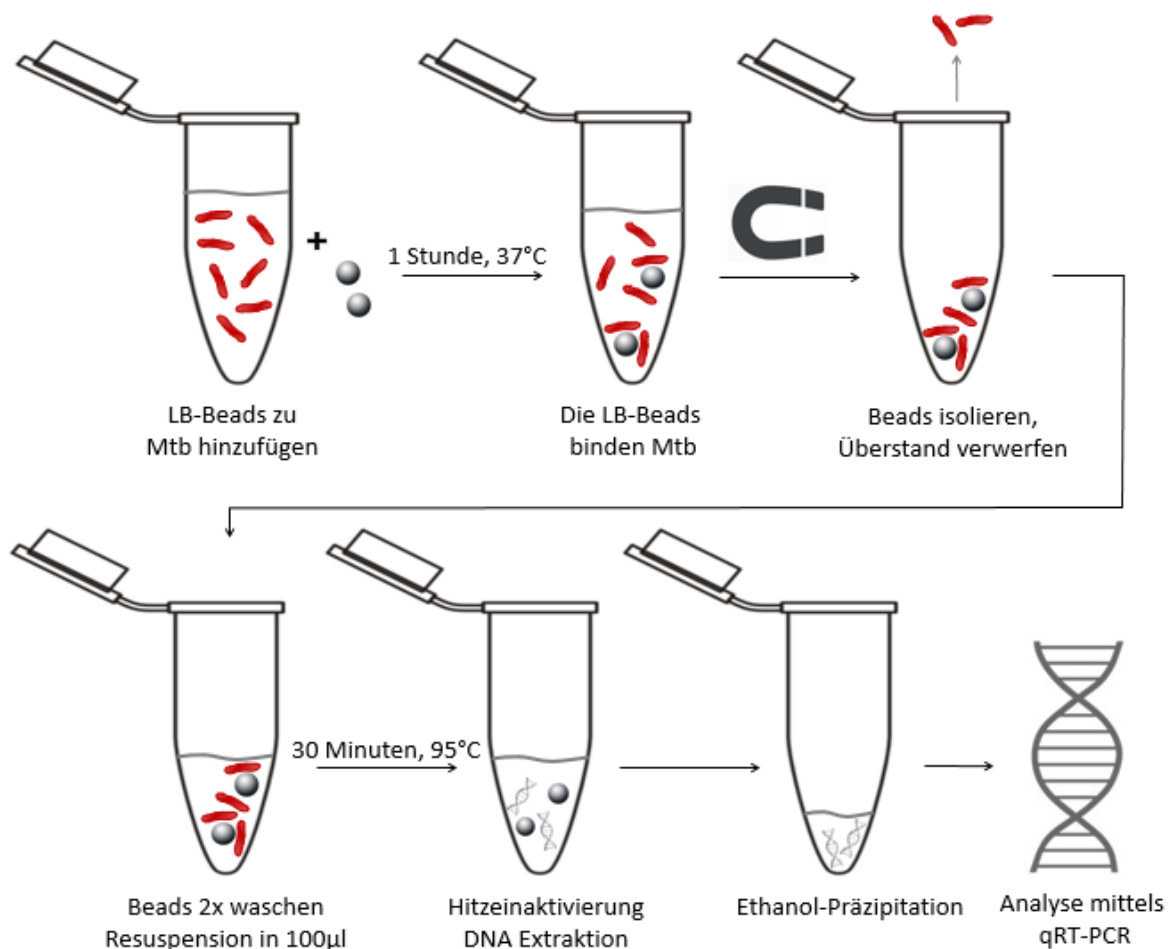


Abbildung 9: Einzelne Schritte des entwickelten Adhäsionsassays – magnetische Separation und Analyse von Mtb aus PBS. Mit Lipobiotin funktionalisierte Beads als verschiedene Mengen Mtb H37Rv wurden mit PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Beads wurden mittels Magnetständers isoliert, der Überstand abgenommen und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Beads zweimal gewaschen und in PBS resuspendiert. Nach einer Hitzeinaktivierung erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR (LightCycler480, Roche).

Die Beads wurden nach der oben beschriebenen Methode (vgl. Kapitel 2.4) funktionalisiert. Sowohl mit Lipobiotin funktionalisierte, als auch unfunktionalisierte Beads ($4,7 \cdot 10^6$ Beads, 25,0µl), wurden mit PBS (375µl) und Mtb H37Rv in verschiedenen Konzentrationen (100µl), für eine Stunde bei 37°C und 60 rpm auf dem Rollenmischer, in Dunkelheit inkubiert. Die Beads wurden anschließend mittels Magnetständers (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) isoliert. Hierfür wurde ca. 30 Sekunden gewartet, bis sich die Beads sichtbar

an der Wand des Eppendorfgefäßes gesammelt hatten. Dann wurde der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Beads zweimal mit PBS (500µl/Gefäß) gewaschen und in PBS (100µl) oder TE-Puffer (pH 9,5/10/11; 100µl) resuspendiert.

2.6 Hitzeinaktivierung von Mtb Bakterien

Die Proben wurden für 30 Minuten bei 95°C erhitzt. Proben, die Beads enthielten, wurden zusätzlich 1400 rpm auf dem Eppendorf Thermomixer R MTP geschüttelt. Die so isolierte DNA wurde bei -80°C gelagert. Diese Schritte wurden in Eppendorfgefäßen mit Schraubverschluss durchgeführt.

2.7 Ethanol-DNA-Fällung

Nachdem die Proben im Rahmen des Adhäsionsassays (vgl. Kapitel 2.5) prozessiert wurden, wurden durch den Magnetständer (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) die magnetischen Beads isoliert und die Überstände (100µl) in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Zu diesen Überständen wurde Ethanol (100%, 900µl), Ammoniumacetat (100µl) und Glyocogen (4µl) hinzugefügt. Nach dem Vortexen der Proben wurden alle Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (30 Minuten, 16,2 x g). Die Überstände wurden verworfen, das Pellet mit Ethanol (75%, 1ml) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 16,2 x g). Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde dann 15 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in H₂O (5µl) wieder gelöst. Abschließend erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR (vgl. Kapitel 2.8).

2.8 Messung mykobakterieller DNA mittels quantitativer Echt-Zeit PCR

Für die Analyse mittels quantitativer Echtzeit PCR (qRT-PCR) wurden TaqMan Universal PCR Master Mix (5µl), non-Beijing Primer (Sense- und Antisense jeweils 0,4µl), fluorescein (FAM)-BlackBerry (BBQ) non-Beijing Sonde (0,1µl), zweifach destilliertes Wasser (3,1µl) und die isolierte Mtb H37Rv DNA (1µl) in einer 96 well Platte miteinander vermischt. Regelmäßig wurden die Beads mit einem Magnetständer (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) an den Rand gezogen, bevor die eigentliche Probe aus dem Überstand pipettiert wurde. Die Konzentrationen in den jeweiligen Reaktionsgefäßen (10µl) betrugen für die Primer 500 nM und für die Sonde 200nM. Die Platte wurde verklebt und zentrifugiert (2 Minuten, 180 x g, 4°C), bevor sie mit dem LightCycler 480 Instrument II (Roche) analysiert wurde¹⁰¹. Die verwendeten Primer, Sonden und das PCR-Protokoll sind in Tabelle 4 bis Tabelle 6 aufgeführt.

Ct steht für „cycle threshold“ und ist durch die Anzahl der Zyklen der PCR definiert, die nötig sind, um ein Fluoreszenzsignal einer Probe zu detektieren, welches über das Hintergrundsignal hinausgeht. Da sich unter optimalen Bedingungen in jedem Zyklus der

PCR die Menge der synthetisierten Nukleinsäuren verdoppelt, verhalten sich Ct-Werte und die Menge der Nukleinsäuren invers zueinander. Während Ct-Werte ≤ 29 große Mengen DNA anzeigen, entsprechen Werte von 30-37 moderaten DNA Konzentrationen und Werte ≥ 38 weisen auf minimale Mengen hin. Negative Messergebnisse wurden in den folgenden Abbildungen mit aufgetragen. Sie sind mit „n.d.“ (DNA nicht detektierbar) gekennzeichnet¹⁰².

Tabelle 4: PCR Primer

Primer Paar	Name	Forward Primer	Reverse Primer
Non-Beijing	nBjF/nBjR	5'-aagcattcccttgacagtcgaa	5'-ggcgcgatgactcgaaagaag

Tabelle 5: FRET-Sonden

FRET-Sonde	Sequenz
Non-Beijing	5'-6FAM -tcatcaaagaccctcttgaaggccc-BBQ

Tabelle 6: qRT-PCR Protokoll (50 Zyklen)

Programm	Temperatur	Zeit
Präinkubation	95°C	10 Minuten
Denaturierung	92°C	15 Sekunden
Primer-Anlagerung/Extension	60°C	60 Sekunden
Abkühlen	40°C	10 Sekunden

2.9 Kolonie formende Einheiten (CFU) nach Adhäsionsassay in PBS

Zur Quantifizierung der an die Beads gebundenen Mykobakterien und in den Überständen wurde der Adhäsionsassay wie in Kapitel 2.5 beschrieben in PBS durchgeführt. Vor dem Schritt der Hitzeinaktivierung wurden die Überstände und die Beads mit verschiedenen zehnfachen Verdünnungen (0,05% Tween 80 in dH₂O) auf 7H10 Agarplatten, die 10% hitzeinaktiviertes Rinderserum enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für drei bis vier Wochen inkubiert, bevor sie anschließend ausgezählt werden konnten.

2.10 Fluoreszenz-Zytometrie nach Adhäsionsassay in PBS

Um die Adhäsion der vitalen Bakterien an die Lipobiotin-Beads (LB-Beads) nachzuweisen, wurde Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Dabei wurde Cherry 10 Mtb (in verschiedenen

Konzentrationen) in PBS (500µl) mit LB-Beads (8,3µl, $1,57 \cdot 10^6$ Beads) für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal mit PBS (500µl) gewaschen und in PBS (300µl) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Beads in FACS-Röhrchen überführt und mittels des BD FACSCanto™ II (B&D Biosciences) analysiert. Die Daten wurden mit der Software FCS Express 6 (Denovo Software, Los Angeles, USA) ausgewertet.

2.11 Interaktion freier Mtb-DNA mit funktionalisierten LB-Beads und nicht funktionalisierten Beads

Mtb H37Rv ($10^4 / 10^5$ in 100µl) wurden mit PBS (400µl) verdünnt. Es erfolgte die thermische Inaktivierung wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Anschließend wurden 50µl der so freigesetzten DNA mit H₂O (12,5µl), LB-Beads ($2,35 \cdot 10^6$ Beads, 12,5µl) oder unfunktionalisierten Beads ($2,35 \cdot 10^6$ Beads, 12,5µl) versetzt. Nach gutem Durchmischen mittels Vortexer wurden die Beads mit einem Magnetständer (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) an den Gefäßrand gezogen und die Überstände mittels PCR analysiert.

2.12 Mehrmalige Inkubation und Variation der Anzahl der LB-Beads

LB-Beads ($4,7 \cdot 10^6$ Beads, 25,0µl) wurden in PBS (375µl) mit Mtb H37Rv (10^6 , 100µl) für eine Stunde bei 37°C und 60rpm auf dem Rollenmischer, in Dunkelheit inkubiert. Die Beads wurden anschließend mit zwei Magneten (Stabmagnet Ø 3,0 x 6,0mm, N48 Nickel, 400g Haftkraft) isoliert. Hierfür wurde ca. 10 Sekunden gewartet, bis sich die Beads sichtbar an dem Magneten angelagert hatten. Aus der Bead-freien Lösung wurden 50µl zur späteren Analyse in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden erneut LB-Beads ($4,7 \cdot 10^6$ Beads, 25,0µl) zur Lösung hinzugegeben und inkubiert. Die genannten Schritte wurden so zweimal wiederholt. Zur Kontrolle wurde H37Rv (10^6 , 100µl) mit LB-Beads ($1,41 \cdot 10^7$ Beads, 75,0µl) in PBS (375µl) für eine Stunde bei 37°C und 60rpm auf dem Rollenmischer, in Dunkelheit inkubiert, bevor auch diese mit den beiden Magneten aus den Proben entfernt wurden. Anschließend wurden alle Proben hitzeinaktiviert (vgl. Kapitel 2.6) und mittels qRT-PCR analysiert (vgl. Kapitel 2.8).

2.13 Rheologie der Speichelproben nach Proteinase K- und DTT-Behandlung

Von fünf verschiedenen gesunden Probanden/-innen wurden jeweils zwei Speichelproben á 5ml gesammelt. Eine Probe wurde nicht weiter behandelt, die andere wurde mit Proteinase K (18U/ml, 30µl) und DTT (2mM, 1µl) für 45 Minuten bei 37°C und 60rpm auf dem Rollenmischer inkubiert. Alle Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor den Viskositätsmessungen wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und für 30 Sekunden bei 2500rpm zentrifugiert, um ggf. feste Bestandteile abzutrennen. Die rheologischen Eigenschaften des Speichels wurden mithilfe des Bohlin Rheometers unter Verwendung der Platte-Platte-Apparatur mit einem Durchmesser von 40mm vermessen. Die Spaltbreite wurde auf 150µm eingestellt und die Temperatur konstant auf 36°C gehalten. Die Änderung der Viskosität von 1ml der jeweiligen Probe wurde bei einem Scherprofil von 1 s⁻¹ bis 100 s⁻¹ aufgezeichnet. Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der Scherprofile von 90 s⁻¹ bis 100 s⁻¹ verwendet. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.14 Einfluss von DTT und Proteinase K auf Mtb und die orale Begleitflora

PBS (400µl, 0,05% Tween 80) mit Mtb (10³ Bakterien, 100µl) oder Speichelproben wurden entweder mit H₂O (31µl) oder Proteinase K (18U/ml, 30µl) und DTT (2mM, 1µl) versetzt und für 45 Minuten bei 37°C und 60rpm auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurden die PBS-Proben mit verschiedenen zehnfachen Verdünnungen (0,05% Tween 80 in PBS) auf 7H10 Agarplatten mit hitzeinaktiviertem Rinderserum (10%) ausgestrichen. Die Speichelproben wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37°C für drei bis vier Wochen inkubiert, bevor sie anschließend ausgezählt werden konnten.

2.15 Assay mit Mtb-versetzten Speichelproben

Speichelproben wurden von gesunden Probanden/-innen gesammelt und bei -20°C gelagert. Dabei wurden keine Entnahmebedingungen oder Ausschlusskriterien definiert (z.B. Zeit nach der letzten Mahlzeit, Zeit nach der letzten Zahnhygiene, Tageszeit, o.ä.). Der Speichelfluss wurde nicht angeregt. Der Zeitraum der Probenabgabewurde nicht erfasst.

Die Speichelproben (5ml) wurden aufgetaut und in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt. Den Proben wurde jeweils Mtb H37Rv (100µl) in verschiedenen Konzentrationen, Proteinase K (10mg/ml, 300µl) und Dithiothreitol (DTT, 1M, 10µl) hinzugefügt. Nach einer Inkubation (45 Minuten, 37°C, Dunkelheit, 60rpm auf Rollenmischer) wurde zum einen eine Referenzprobe (50µl) zum späteren Vergleich abgenommen und thermisch inaktiviert. Das übrige Probenmaterial wurde zentrifugiert (10 Minuten, 800rpm), sodass die nicht gelösten Bestandteile des Speichels pelletierten. Anschließend wurde der Überstand in ein anderes

15ml Falcon Röhrchen überführt und diesem 25µl LB-Beads ($4,7 \times 10^6$ Beads, 25µl) hinzugefügt. Es erfolgte eine weitere Inkubation (60 Minuten, 37°C, Dunkelheit, 60rpm auf dem Rollenmischer). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 Minuten, 3629 x g), um die Beads zu pelletieren und anschließend separieren zu können. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS (500µl) aufgenommen und mit Hilfe des Magnetständers (DynaMag-2 Magnet, Life technologies) zweimal mit PBS (500µl/Gefäß) gewaschen. Eine Resuspension der Beads erfolgte in TE-Puffer (100µl, pH10). Die Proben wurden thermisch inaktiviert (vgl. Kapitel 2.6) und die DNA gefällt (vgl. Kapitel 2.7). Anschließend wurden die Proben mittels qRT-PCR analysiert.

2.16 Einfluss von Penicillin G und Amphotericin B auf Mtb und die Begleitflora

Zu PBS (400µl, 0,05% Tween 80) wurde Mtb (10^3 Bakterien, 100µl), Proteinase K (18U/ml) und DTT (2mM) hinzugefügt und für 45 Minuten bei 37°C und 60rpm auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend werden die Proben (0,05% Tween 80 in PBS) auf 7H10 Agarplatten, mit hitzeinaktiviertem Rinderserum (10%), Amphotericin B (560µl/100ml Medium) und Penicillin G (10.000 IU/ml; 1ml/100ml Medium) oder 7H10 Platten ohne antimikrobielle Substanzen ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für drei bis vier Wochen inkubiert, bevor sie anschließend ausgezählt werden konnten.

Zu Speichel (500µl) wurde Proteinase K (18U/ml) und DTT (2mM) hinzugefügt und für 45 Minuten bei 37°C und 60rpm auf dem Roller inkubiert. Anschließend werden die Proben (0,05% Tween 80 in PBS) auf 7H10 Agarplatten, mit hitzeinaktiviertem Rinderserum (10%), Penicillin Amphotericin B (560µl/100ml Medium) und Penicillin G (10.000 IU/ml; 1ml/100ml Medium) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für drei bis vier Wochen inkubiert, bevor sie anschließend ausgezählt wurden.

2.17 CFU nach Adhäsionsassay in Speichel

Um das Wachstum von Mykobakterien an den Beads und in den Überständen nach Durchführung des Assays in Speichelproben zu untersuchen, wurde dieser wie beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde nicht H37Rv verwendet, sondern Cherry 10 Mtb. Vor der Hitzeinaktivierung wurden die Überstände und die Beads (0,05% Tween 80 in PBS) auf 7H10 Agarplatten, mit hitzeinaktiviertem Rinderserum (10%), Amphotericin B (560µl/100ml Medium) und Penicillin G (10.000 IU/ml; 1ml/100ml Medium) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für vier Wochen inkubiert, bevor sie ausgezählt wurden.

2.18 Verblindete Testung von Patientenproben

Speichelproben wurden von Patienten/-innen mit einer medikamenten-sensiblen, infektiösen pulmonalen Tuberkulose gesammelt. Wie bei den gesunden Probanden/-innen

wurden keine Entnahmebedingungen aufgestellt oder Hilfsmittel zur Anregung des Speichelflusses eingesetzt. Bevorzugt wurden Proben von Patienten/-innen mit einem positiven mikroskopischen Sputumbefund mittels ZN-Färbung (semiquantitativ +++ bis +/-) gesammelt.

Insgesamt wurden 20 Proben verblindet, davon zehn Patientenproben und zehn Speichelproben von gesunden Probanden/-innen. Diese Proben wurden gleichzeitig verarbeitet. Die Prozessierung erfolgte wie in Kapitel 2.15 beschrieben, außer dass keine Mtb H37Rv zu den Proben hinzugefügt wurden.

Tabelle 7: Mikroskopische Graduierung der Ziehl-Neelsen-Färbung

Ergebnis	Graduierung	Anzahl der säurefesten Erreger
Negativ	-	Kein Erreger pro 100 Gesichtsfelder
Plus/Minus	+/-	1-9 Erreger pro 100 Gesichtsfelder
Einfach positiv	+	10-99 Erreger pro 100 Gesichtsfelder
Zweifach positiv	++	1-10 Erreger pro Gesichtsfeld
Dreifach positiv	+++	>10 Erreger pro Gesichtsfeld

2.19 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde sowohl GraphPad Prism 5 und 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA) und R 3.5.0 (Open Source) durchgeführt. In Absprache mit Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. König wurden die Daten, falls nicht anders beschrieben in Form der nicht-parametrischen Varianzanalyse mittels "Modified ANOVA-Type Statistic for the Whole-Plot Factors" durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bindung von Mtb an magnetische Beads

3.1.1 CFU nach Adhäsionsassay in PBS

In ihrer Dissertation ist es Dr. Katharina Kolbe gelungen, unter Verwendung der Durchflusszytometrie Lipobiotin als einen Liganden zu identifizieren, mit dem es möglich ist, Mtb aus Flüssigkeiten zu binden⁹⁶. Dieser Ligand wurde anschließend an magnetische Beads gekoppelt und die so beschichteten Beads genutzt, um Mtb aus Puffern zu binden.

Von Dr. Katharina Kolbe wurde ebenfalls mittels PCR-Analyse gezeigt, dass Lipobiotin-Beads (LB-Beads) Mtb in größerem Maße binden können als unfunktionalisierte Beads⁹⁶. Ergänzend sollte durch eine CFU-Analyse gezeigt werden, dass Lipobiotin ein entscheidender Faktor für die Interaktion mit den Bakterien ist. Hierzu wurden sowohl mit Lipobiotin beschichtete, als auch unbeschichtete Beads mit Bakterien inkubiert.

In einem Volumen von 500µl wurden verschiedene Bakterienkonzentrationen angesetzt und entweder funktionalisierte oder unfunktionalisierte Beads hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte in PBS für eine Stunde bei 37°C. Nachdem die Beads unter Verwendung eines Magnetständers isoliert und zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurden sowohl die Beads (Abbildung 10), als auch die Überstände ausplattiert (Abbildung 11) und die wachsenden Kolonien gezählt.

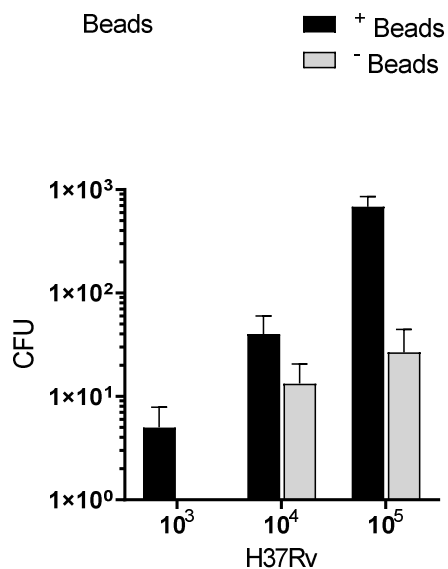


Abbildung 10: CFU (Beads) nach Inkubation von Mtb mit Lipobiotin- bzw. unfunktionalisierten Beads. H37Rv wurde entweder mit LB- (+Beads) oder unfunktionalisierten Beads (-Beads) inkubiert. Nach Extraktion und Waschen der Beads wurden diese auf 7H10 Platten ausplattiert. Dargestellt sind CFU +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. CFU sind logarithmisch auf der Y-Achse, die Bakterienmengen auf der X-Achse aufgetragen. $p=0,0028$.

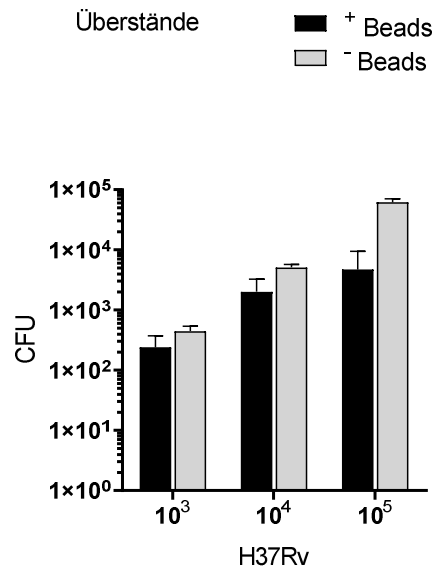


Abbildung 11: CFU (Überstände) nach Inkubation von Mtb mit Lipobiotin- bzw. unfunktionalisierten Beads. H37Rv wurde entweder mit LB- oder unfunktionalisierten Beads inkubiert. Überstände wurden abgenommen und auf 7H10 Platten ausplattiert. Dargestellt sind CFU +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. CFU sind logarithmisch auf der Y-Achse, die Bakterienmengen auf der X-Achse aufgetragen. $p=0,169$

Abbildung 10 zeigt logarithmisch Mtb Kolonien nach dem Ausplattieren der Beads.

Für die LB-Beads zeigte sich in jeder Probe Wachstum auf den Nährböden. Im Mittel lagen die Werte bei 5 Kolonien (10^3 eingesetzte Bakterien; SD=4,1), 40 Kolonien (10^4 eingesetzte Bakterien; SD=28,6) und 680 Kolonien (10^5 eingesetzte Bakterien SD=255,1).

Bei den unfunktionalisierten Beads hingegen war erst ab einer Bakterienmenge von 10^4 ein Wachstum auf der Agarplatte feststellbar. Für 10^4 Bakterien ergaben sich im Schnitt nach der Inkubation mit unbeschichteten Beads 13 Bakterienkolonien (SD=10,3), und für 10^5 Bakterien 27 Kolonien (SD=24,9).

Die Anzahl der vitalen Bakterien war somit an den unfunktionalisierten Beads niedriger als den LB-Beads. Das Wachstum bei den Proben der unfunktionalisierten Beads betrug in Relation zu den LB-Beads für 10^4 Bakterien lediglich 33%; für 10^5 Bakterien sogar nur 4%. Diese Ergebnisse zeigen, dass vitale Bakterien während der Inkubation an magnetische Beads binden. Ist eine Lipobiotinbeschichtung auf die magnetischen Beads aufgetragen, können signifikant mehr Bakterienkolonien auf den Platten identifiziert werden als nach Inkubation mit unbeschichteten Beads. Somit ist davon auszugehen, dass Lipobiotin eine tragende Rolle für die Bindung von Mtb an die Beads besitzt.

In

Abbildung 11 sind die entsprechenden Überstände zu den Experimenten aus Abbildung 10 dargestellt. Diese wurden nach der Inkubation abgenommen und ebenfalls ausplattiert.

Hier zeigte sich, dass in allen Proben Wachstum von Mtb zu verzeichnen ist. Dabei ist zu beobachten, dass im Überstand der LB-Beads weniger Bakterien detektierbar waren verglichen mit den Überständen der unfunktionalisierten Beads. Bei 10^3 Bakterien waren 50% weniger Bakterien in den Überständen nach Inkubation mit LB-Beads (240 Kolonien; SD=189,9) ersichtlich als in den Proben der unfunktionalisierten Beads (448 Kolonien SD=135,5). Je mehr Bakterien eingesetzt wurden, desto größer war dieser Unterschied. Bei 10^4 Bakterien entsprach die Anzahl der Kolonien der unfunktionalisierten Beads 39% der LB-Bead-Proben. Bei 10^5 Bakterien waren es nur 8%.

Diese Daten zeigen, dass mehr Bakterien in den Überständen der unfunktionalisierten Beads verblieben. Dies deutet darauf hin, dass weniger Bakterien durch die Beads gebunden und damit herausgezogen werden konnten. Es lag keine statistische Signifikanz vor.

Vergleicht man die Anzahl der Kolonien der Überstände mit den dazugehörigen Beads, zeigt sich, dass zwar Mykobakterien an die Beads gebunden werden, die Mehrzahl der Bakterien jedoch im Überstand verbleibt.

3.1.2 Fluoreszenz-Zytometrie nach Adhäsionsassay in PBS

Der Effekt der Lipobiotin-Beschichtung auf die Bindung von Mtb an magnetische Beads wurde ergänzend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurde der Assay erneut mit LB-Beads und unfunktionalisierten Beads durchgeführt. Die Analyse erfolgte nach Isolation und Waschen der Beads.

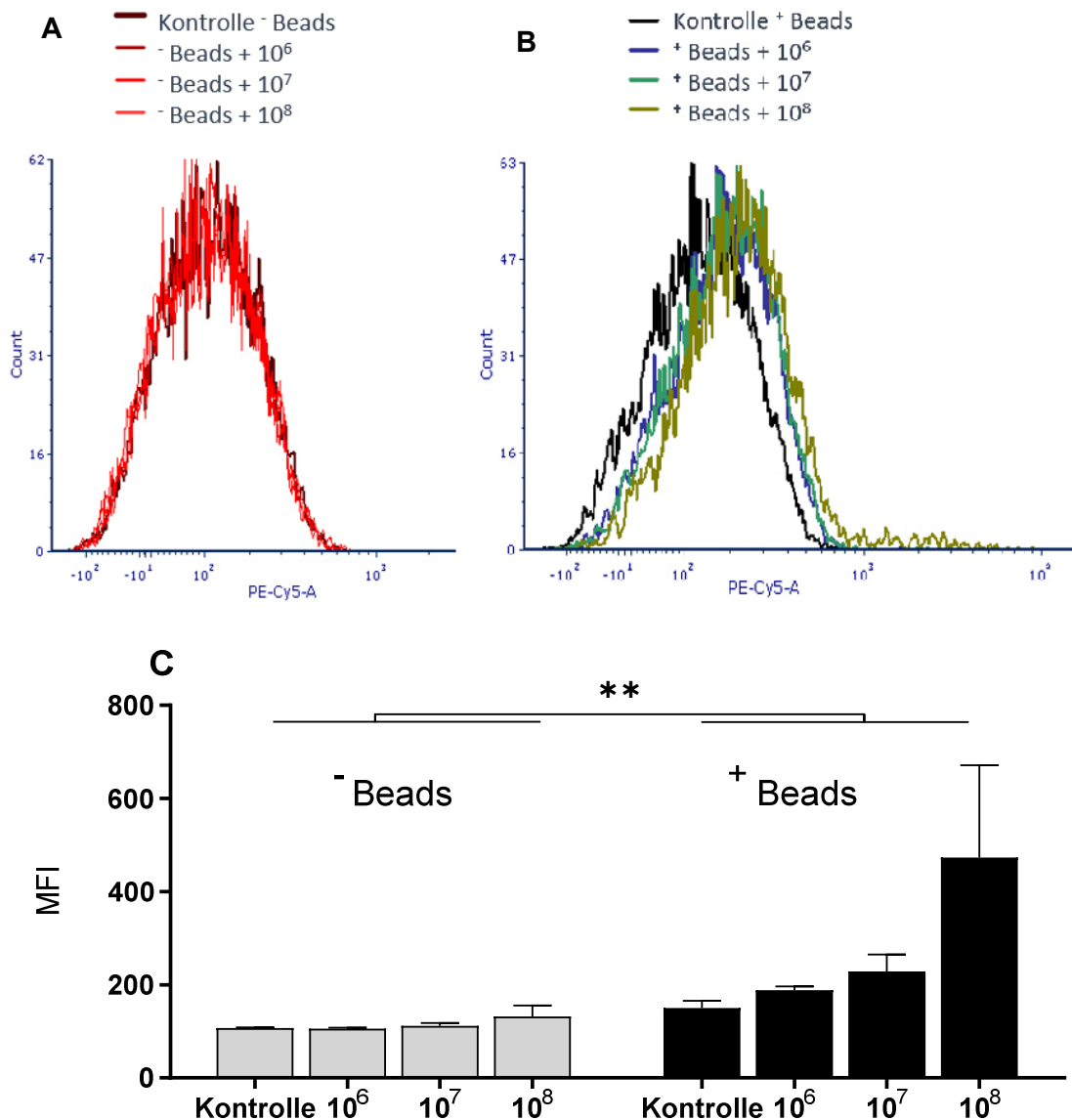


Abbildung 12: Fluoreszenzanalyse nach Assay mit LB- und unfunktionalisierten Beads. Mtb Cherry 10 wurden mit LB- oder unfunktionalisierten Beads für 1h inkubiert. Als Kontrollen wurden Beads ohne Inkubation mit Bakterien gemessen. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Abbildungen zeigen die Fluoreszenzintensitäten der Proben mit unfunktionalisierten Beads (**A**) und mit LB-Beads (**B**) jeweils eines Experimentes. Außerdem ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), Mittelwert +/- SEM von vier unabhängigen Experimenten gezeigt (**C**). p=0,0047.

In Abbildung 12A und Abbildung 12B ist jeweils ein Experiment dargestellt, in dem zunächst eine Kontrolle, also nur LB-Beads oder unfunktionalisierte Beads analysiert wurden. Darüber hinaus sind die Beads mit verschiedenen Bakterienmengen (10^6 - 10^8) inkubiert und

analysiert worden. Dies ermöglichte den Vergleich der Autofluoreszenz der Beads mit der Fluoreszenz nach Inkubation mit Mtb. Eine Zunahme der MFI nach Inkubation ließe sich durch Bindung von fluoreszierenden Mtb an die Beads erklären.

In Abbildung 12A zeigt sich, dass alle Kurven aufeinander liegen und um eine MFI von 105 (SD=4,3) schwanken. Die Fluoreszenz nach Inkubation unterschied sich also nicht von der Autofluoreszenz der unfunktionalisierten Beads.

In Abbildung 12B, sind die Ergebnisse der funktionalisierten LB-Beads gezeigt. Die Kontrolle ergab eine MFI von 150 (SD=32,1). Damit wiesen die LB-Beads eine höhere Autofluoreszenz auf. In verschiedenen Blautönen sind neben der Kontrolle auch die Proben nach Inkubation mit unterschiedlichen Mtb-Konzentrationen aufgetragen. Die Kurven sind nach Inkubation nach rechts verlagert, welches eine höhere Fluoreszenzintensität widerspiegelt. Es kam abhängig von der Keimkonzentration zu einer Zunahme der Fluoreszenz.

In Abbildung 12C sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Hier zeigte sich die gleiche Tendenz. Die MFI der unfunktionalisierten Beads schwankte weiterhin um 107 (SD=3,4), und auch die MFI nach Inkubation bewegte sich in diesem Bereich. Nach Inkubation mit 10^8 Bakterien zeigte sich allerdings eine leichte Zunahme der MFI auf 132 (SD=47,3).

Bei den LB-Beads hingegen zeigte sich schon bei einer Inkubation mit 10^6 Bakterien eine Zunahme der MFI und diese stieg mit höheren Bakterienkonzentrationen stetig an. Die Kontrolle wies eine MFI von 150 (SD=32,1) auf und vervielfachte sich um mehr als das Dreifache nach der Inkubation mit 10^8 Bakterien (MFI=473; SD=396,1).

Die Ergebnisse bekräftigten die CFU Analysen dahingehend, dass die Beschichtung mit Lipobiotin einen positiven Effekt auf die Bindung von Mtb an magnetische Beads hat. Bei dieser Beschichtung kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Fluoreszenz, die durch die Anlagerung von fluoreszierenden Bakterien an die Beads erklärbar ist.

3.1.3 Quantitative Echtzeit PCR Inkubation der Beads mit Mtb in PBS

Zur weiteren Validierung sollte dieser Effekt auch mittels PCR gezeigt werden. Dazu wurden wie in den vorherigen Experimenten Mtb zum einen mit unfunktionalisierten Beads und zum anderen mit LB-Beads inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Beads isoliert und der Überstand in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde anschließend in der PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

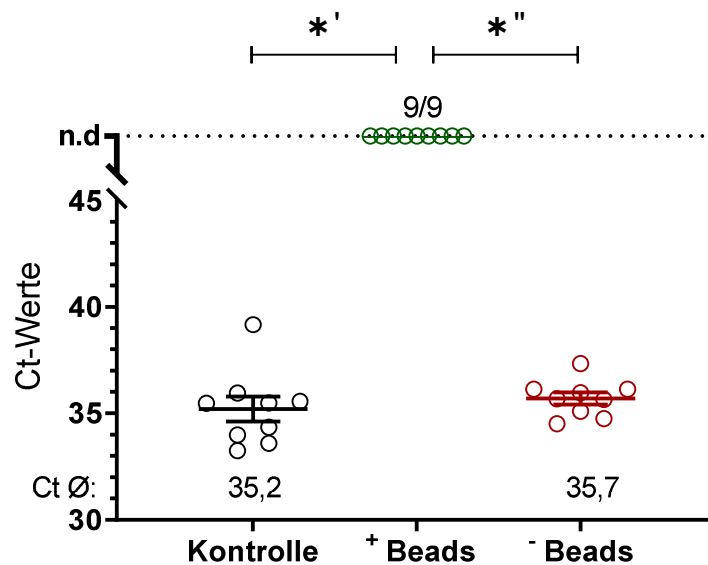


Abbildung 13: Analyse der Überstände nach Inkubation von Mtb mit LB- und unfunktionalisierten Beads in PBS. Mtb H37Rv ($10^4/500\mu\text{l}$) wurden mit LB- (grün) oder unfunktionalisierten Beads (rot) in PBS inkubiert und anschließend isoliert. Der Überstand wurde abgenommen und nach der Hitzeinaktivierung mittels PCR quantifiziert. Kontrolle (schwarz): Mtb H37Rv ($10^4/500\mu\text{l}$) in PBS. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). *' $p=0,0191$; *'' $p=0,0293$.

Die Kontrolle besaß einen mittleren Ct-Wert von 35,2 (SD=1,8). Bei allen neun Replikaten der Probe nach Inkubation mit LB-Beads waren die Messungen negativ, es konnte keine mykobakterielle DNA detektiert werden. Bei den Überständen der unfunktionalisierten Beads zeigten alle Replikate und die Kontrolle ein Signal. Der mittlere Ct-Wert lag in dieser Probe bei 35,7 (SD=0,9). So lag der Messwert lediglich 0,5 über dem der Kontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass verglichen mit der Kontrolle der DNA Gehalt der Probe nach Inkubation mit LB-Beads signifikant reduziert wurde. Der DNA Gehalt der Proben, die mit unfunktionalisierten Beads inkubiert wurden, änderte sich nicht signifikant. Die Ergebnisse könnten dahingehend interpretiert werden, dass die Bakterien an die Lipobiotin-Oberfläche der magnetischen Beads binden und anschließend mit ihnen extrahiert wird. Nach der Hitzeinaktivierung ist in der Analyse mittels PCR keine mykobakterielle DNA mehr nachweisbar. Die unfunktionalisierten Beads hingegen scheinen Mtb in einem geringeren Ausmaß zu binden, so dass auch nach der Inkubation im Überstand mykobakterielle DNA

nachweisbar ist, der Menge, die der Kontrolle entspricht. Somit konnten die Ergebnisse der CFU-Analyse (vgl. Kapitel 3.1.1) und der Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 3.1.2) nicht durch die PCR bestätigt werden. Anders als in der CFU-Analyse sind in den Überständen mittels PCR keine Mtb-Bestandteile nachweisbar. Indirekt zeigt die PCR jedoch, dass Mtb an die magnetischen Beads gebunden wird, da in den Überständen keine Mtb-DNA nachweisbar ist. Die Beschichtung mit Lipobiotin scheint diesen Effekt zu verstärken.

Ergebnisse 3.1: Zusammenfassung

- LB-Beads sind in der Lage, Mtb aus Lösung zu binden. Dies ist sowohl durch die CFU-Analyse, die Durchflusszytometrie und die PCR gezeigt worden.
- Unfunktionalisierte Beads interagieren ebenfalls mit den Mykobakterien, allerdings in einem geringeren Ausmaß.

3.2 Adhäsionsassay in Puffern

In den vorherigen Experimenten wurde mittels Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 3.1.2) und CFU-Analysen (vgl. Kapitel 3.1.1) gezeigt, dass LB-Beads Mtb aus PBS binden können. Ergänzend zeigte dies auch indirekt die PCR Analyse. Da in den Überständen der LB-Beads in der PCR Analyse jedoch keine Mtb-DNA nachgewiesen werden konnte, soll nun untersucht werden, ob die Beads nicht nur mit den Bakterien, sondern auch mit der mykobakteriellen DNA interagieren.

3.2.1 Optimierung des Adhäsionsassays

3.2.1.1 Bindungsverhalten freier Mtb-DNA an Beads

In dem vorausgegangenen Experiment (vgl. Kapitel 3.1.3) wurde eine verminderte Detektierbarkeit der Mtb-DNA in den Überständen nach Inkubation mit LB-Beads gezeigt. Nun sollte untersucht werden, ob diese verminderte Detektierbarkeit mit einer Interaktion zwischen Mtb-DNA und magnetischen Beads zusammenhängt. Da die Beads bislang nicht mit in die PCR gegeben, sondern vorher abgenommen wurden, könnte die verminderte Detektierbarkeit von Mtb-DNA auf eine solche Interaktion hindeuten. Um dies zu überprüfen, wurde freie Mtb-DNA mit LB-Beads und unfunktionalisierten Beads versetzt. Anschließend wurden die Beads wieder abgetrennt und die Überstände mittels qRT-PCR analysiert.

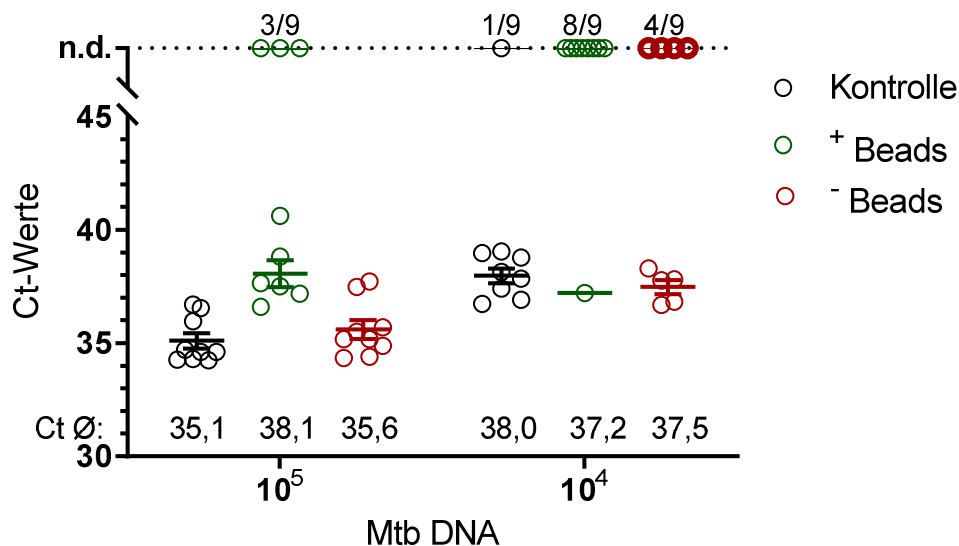


Abbildung 14: Interaktion von thermisch extrahierter Mtb-DNA mit LB- und unfunktionalisierten Beads. 50µl Mtb H37Rv DNA wurde thermisch isoliert und mit 12,5µl H₂O (schwarz), LB-Beads (grün) oder unfunktionalisierten Beads (rot) versetzt. Beads werden abgetrennt und Proben mittels qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). p=0,0445.

In Abbildung 14 wurden keine vitalen Bakterien mit Beads inkubiert, sondern hitzeinaktivierte Bakterien, also freie Mtb-DNA mit Zellwandbestandteilen.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass bei einer Menge, die der DNA von 10^5 Bakterien entspricht, die Kontrolle bei mittleren Ct-Werten von 35,1 (SD=1,0) liegt. Die mit LB-Beads versetzten Proben zeigen einen Mittelwert von 38,1 (SD=1,4), also drei Ct-Werte höher als die Kontrollen. Darüber hinaus sind nur sechs von neun Replikaten der LB-Bead-Proben positiv. Für die unfunktionalisierten Beads ergibt sich ein Mittelwert von 35,6 (SD=1,2), wobei alle Replikate ein Signal zeigen.

Bei 10^4 Bakterien hat die Kontrolle einen Ct-Mittelwert von 38,0 (SD=0,9) sowie ein negatives Replikat. Bei den LB-Beads hingegen ist nur eine Messung von neun positiv. Diese hat einen Ct-Wert von 37,2 (SD=0). Der Mittelwert der unfunktionalisierten Beads liegt bei 37,5 (SD=0,7) und fünf von neun Messungen zeigten ein Signal.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mtb in einer Menge, die 10^5 Bakterien entspricht, vermindert detektiert wurde, nachdem eine Inkubation mit LB-Beads erfolgte. Der Mittelwert war drei Ct-Werte größer als der Kontrollwert und nur zwei Drittel der Messungen zeigten ein Signal. Wurde die DNA mit unfunktionalisierten Beads versetzt, erhöhte sich der Mittelwert nur geringfügig, aber alle Replikate blieben positiv.

Bei 10^4 Bakterien zeigte sich Ähnliches. Dort war auffällig, dass nach der Inkubation mit LB-Beads nur noch ein von neun Replikaten ein Signal in der PCR zeigte. Nach Inkubation mit unfunktionalisierten Beads waren fünf von neun Replikaten positiv. Somit nahm verglichen zur Kontrolle nach Inkubation mit LB-Beads die Zahl negativer Messergebnisse signifikant zu.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass freie Mtb-DNA tatsächlich mit magnetischen Beads interagiert. Diese Wechselwirkung scheint bei einer Beschichtung der Beads mit Lipobiotin besonders ausgeprägt zu sein.

Um zu überprüfen, dass die Interaktion tatsächlich zwischen freier DNA und den Beads stattfindet, wurde nun statt thermisch freigesetzter DNA reine Mtb-DNA verwendet. Diese wurde durch die Forschungsgruppe „Molekulare und Experimentelle Mykobakteriologie“ des Forschungszentrums Borstel isoliert und aufgereinigt. Sie weist in den Nanodrop-Analysen einen höheren Reinheitsgrad als thermisch isolierte DNA auf (thermisch extrahiert: $\frac{260}{280} = 1,31$, $\frac{260}{230} = 0,33$; aufgereinigte DNA: $\frac{260}{280} = 1,81$, $\frac{260}{230} = 1,77$). Die so extrahierte und aufgereinigte DNA wurde mit dem gleichen Verfahren wie im zuvor gezeigten Experiment prozessiert und analysiert.

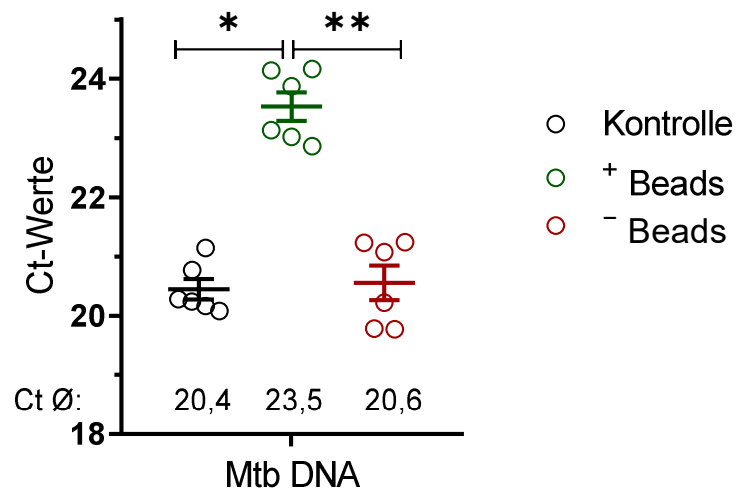


Abbildung 15: Interaktion von aufgereinigter Mtb-DNA mit LB- und unfunktionalisierten Beads. 20µl H37Rv DNA wurden mit 1µl H₂O (schwarz), LB-Beads (grün) oder unfunktionalisierten Beads (rot) versetzt. Die Beads werden abgetrennt und Proben mittels qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von jeweils zwei Experimenten mit drei technischen Replikaten. * p=0,01826; ** p=0,00815.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Analyse von reiner Mtb-DNA nach Inkubation mit Wasser als Kontrolle, LB-Beads oder unfunktionalisierten Beads.

Die Kontrolle hatte einen Mittelwert von 20,4 (SD=0,4) und das Mittel der LB-Bead-Probe lag bei 23,5 (SD=0,6), also 3,1 höher. Bei den unfunktionalisierten Beads betrugen die Messwerte im Mittel 20,6 (SD=0,7) und die Differenz zur Kontrolle damit 0,2.

Die Daten zeigen auch hier eine signifikante Erhöhung der Ct-Werte reiner Mtb-DNA nach Inkubation mit LB-Beads, was eine verminderte Detektierbarkeit bedeutet. Nach Inkubation mit unfunktionalisierten Beads kam es nur zu einer geringfügigen Verminderung der Detektierbarkeit freier Mtb-DNA.

Dieses Experiment bestätigt, dass eine Interaktion von freier Mtb-DNA mit magnetischen Beads besteht und diese durch eine Beschichtung mit Lipobiotin verstärkt wird.

3.2.1.2 Analyse der Proben mit magnetischen Beads in der PCR

Eine Möglichkeit, die reduzierte Detektion aufgrund der Interaktion der LB-Beads mit der Mtb-DNA zu umgehen, ist es die Beads vor der PCR nicht mittels eines Magnetständers abzutrennen, sondern die Beads mit in die PCR zu pipettieren. So wäre es denkbar, dass auch DNA, die an die Beads gebunden ist, in der PCR detektiert wird. Um dies zu testen, wurde der Assay wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt und die Proben zweimal in der PCR analysiert. Einerseits wurden die LB-Beads mit einem Magnetständer abgenommen und nur der Überstand in die PCR pipettiert, andererseits wurden die Beads nicht isoliert, sondern mit in die PCR gegeben.

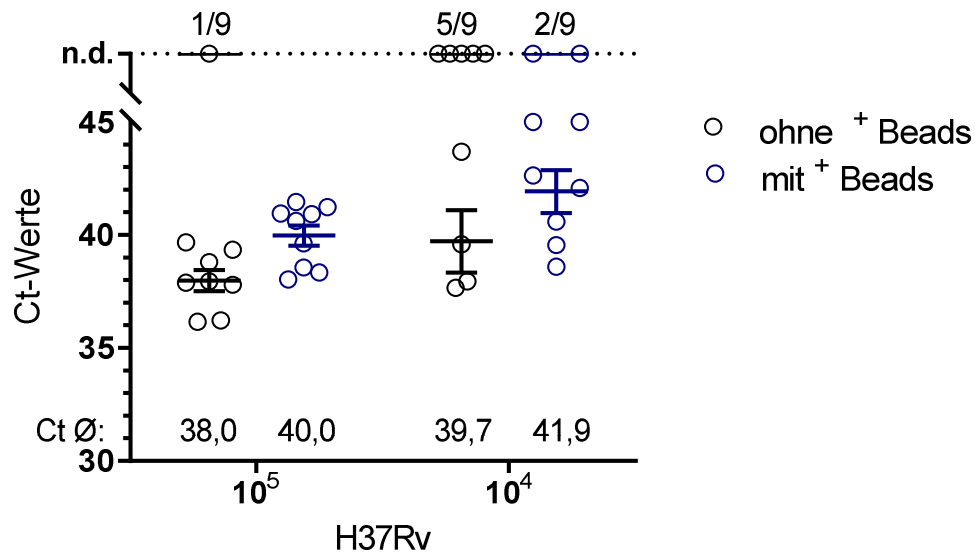


Abbildung 16: Detektierbarkeit der Mtb-DNA bei An- und Abwesenheit von LB-Beads in der PCR. Adhäsionsassay wird durchgeführt und die LB-Beads in PBS resuspendiert. Die Beads werden entweder vor der PCR isoliert (blau) oder mit in die qRT-PCR gegeben (schwarz). Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). ANOVA-Test: $p=0,0209$.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der PCR-Analysen der Proben, die keine LB-Beads enthalten haben, mit den gleichen Proben verglichen, bei denen die Beads vorher nicht isoliert wurden. Dies ermöglicht es, den Einfluss der magnetischen Beads auf die PCR zu beurteilen.

Die Proben ohne LB-Beads weisen bei 10^5 Bakterien einen mittleren Ct-Wert von 38 (SD=1,3) auf, wobei ein Replikat negativ war. Dem gegenübergestellt ist die Probe mit LB-Beads, die einen Mittelwert von 40 (SD=1,4) besitzt und keine negativen Messungen zeigt. Bei 10^4 Bakterien liegt der Mittelwert der Probe ohne Beads bei 39,7 (SD=2,8). Gleichzeitig sind hier fünf von neun Replikaten negativ. Bei der Probe mit Beads sind nur zwei von neun Replikaten positiv. Der Mittelwert liegt dort bei 41,9 (SD=2,5).

Werden die Mittelwerte betrachtet, so haben die Proben ohne LB-Beads einerseits geringere Ct-Werte, verglichen mit den Proben, bei denen Beads in die PCR gegeben wurden. Andererseits kann dort in weniger Replikaten ein Signal detektiert werden. Aufgrund der signifikanten Mittelwerterhöhung wurde auf die Anwesenheit der Beads in der PCR verzichtet, um die Aussagekraft der detektierten Ct-Werte nicht zu beeinflussen.

3.2.1.3 Einfluss von Salzen auf die Interaktion von DNA und LB-Beads

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion zwischen Mtb-DNA und den beschichteten Beads zu verringern, sollte im folgenden Experiment untersucht werden. Es wurde geprüft, ob Lithiumchlorid (LiCl) oder Natriumchlorid (NaCl) die Interaktion zwischen freier Mtb-DNA und der Lipobiotin-Beschichtung reduzieren kann. Wie auch in der Methode der Ethanolfällung könnten die positiv geladenen Ionen (Na^+ oder Li^+) sich an den negativ geladenen Phosphatrücken der DNA anlagern und die Ladungen neutralisieren¹⁰³. Im folgenden Experiment wurden, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, Mtb Bakterien mit LB-Beads inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von NaCl und LiCl versetzt. Die Analyse erfolgte mittels qRt-PCR.

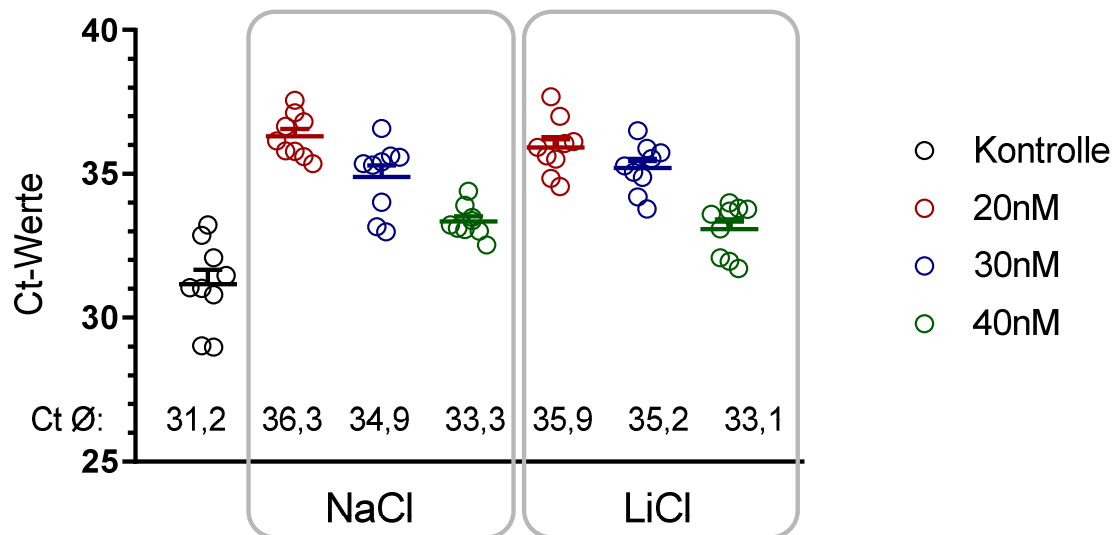


Abbildung 17: Einfluss von NaCl und LiCl auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA. Adhäsionsassay von 10^6 H37Rv mit LB-Beads. Kontrolle (schwarz): 10^6 Mtb/500 μ lPBS. Beads werden nach Assay in PBS (100 μ l) resuspendiert. Anschließend werden verschiedene Konzentrationen der Salze hinzugegeben 20nM (rot), 30nM (blau), 40nM (grün). Nach Isolation der Beads erfolgte Analyse mittels qRT-PCR. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. $p=0,6512$.

Die Kontrolle zeigte einen mittleren Ct-Wert von 31,2 (SD=1,5). Bei den Proben, die mit NaCl versetzt wurden, zeigten sich größere Ct-Werte. Bei 20mM NaCl liegt er bei 36,3 (SD=0,8). Wurden höhere Konzentrationen der Salze hinzugegeben, so verringerte sich der Mittelwert (30mM: 34,9 (SD=1,2); 40mM: 33,3 (SD=0,5)), allerdings lagen sie immer noch über dem Wert der Kontrolle.

Dies war ebenfalls nach der Zugabe von LiCl zu beobachten. Verglichen mit der Kontrolle stieg bei einer Salzkonzentration von 20mM der Ct-Wert auf 35,9 (SD=1,0) an. Bei 30mM lag er bei 35,2 (SD=0,8) und bei 40mM LiCl sank er auf 33,1 (SD=0,9) ab.

Werden die Proben betrachtet, die mit Salzen versetzt wurden, zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Salzkonzentration und den Ct-Werten. Je höher die Salzkonzentration war, desto niedriger waren die Ct-Werte. Blickt man jedoch auf die Kontrolle, so lagen die Mittelwerte aller getesteten Salzkonzentrationen über dem der Kontrolle. Dies bedeutet, dass durch Zugabe von NaCl oder LiCl in den getesteten Konzentrationen die Detektierbarkeit von Mtb-DNA nicht verbessert, sondern sogar vermindert wurde.

3.2.1.4 Einfluss von pH-Werten auf die Interaktion von DNA und LB-Beads

Ein weiterer Ansatz, die Interaktion zwischen Mtb-DNA und den positiv geladenen Lysinen des Lipobiotins zu unterbinden, ist die Resuspension der Beads ins basische Milieu, bevor die Bakterien hitzeinaktiviert werden. Lysin besitzt einen isoelektrischen Punkt von 9,75¹⁰⁴. Das bedeutet, dass bei diesem pH-Wert das Molekül als Zwitterion und damit in der Gesamtheit ungeladen vorliegt. Gleichen sich die Ladungen des Moleküls bei einem pH-Wert von 9,75 aus, könnte die Interaktion mit negativ geladener DNA vermindert und die Detektierbarkeit von Mtb-DNA dadurch verbessert werden. Um dies zu überprüfen, wurden Mtb zusammen mit LB-Beads wie im zuvor beschriebenen Assay (vgl. Kapitel 3.2) inkubiert. Die Resuspension der Beads vor der Hitzeinaktivierung erfolgte in 100µl PBS (pH7,4) oder TE-Puffer mit pH-Werten von 9,5, 10 und 11. Anschließend erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR.

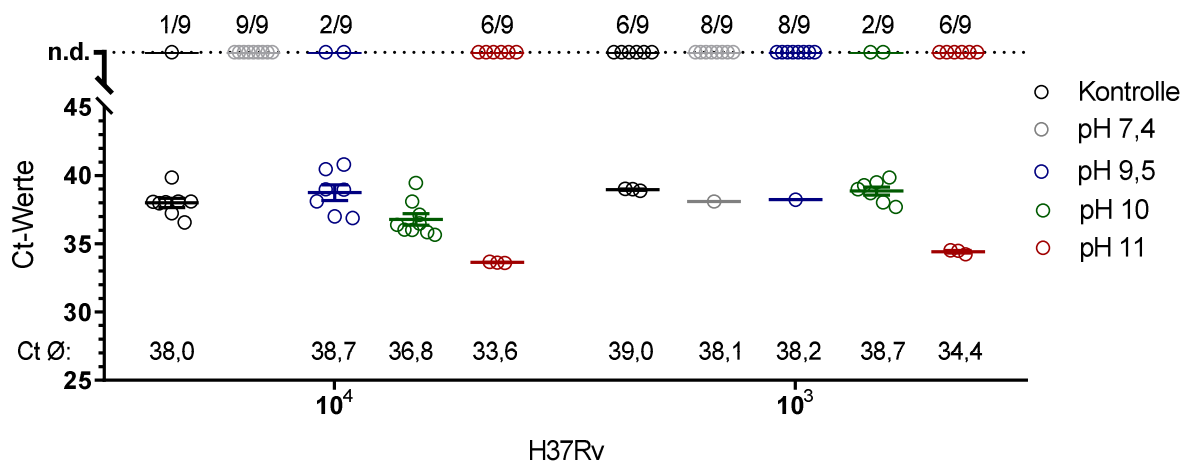


Abbildung 18: Einfluss des pH-Wertes auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA. Adhäsionsassay von H37Rv mit LB-Beads. Kontrolle (schwarz) Bakterien in PBS, Beads werden nach Assay in Puffern (100µl) mit verschiedenen pH-Werten (pH7,4 (grau), pH9,5 (blau), pH10 (grün), pH11 (rot)) resuspendiert. Analyse mittels qRT-PCR. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). $p=0,0283$.

Bei 10⁴ Bakterien/500µl zeigte die Kontrolle im Mittel einen Ct-Wert von 38 (SD=0,9). Hierbei waren acht von neun Replikaten positiv. Nach Inkubation der Bakterien mit LB-Beads und einer Resuspension in PBS waren alle Replikate negativ. Es konnte in keiner Messung DNA detektiert werden. Nach Resuspension der Beads in einem pH-Wert von 9,5 waren sieben von neun Replikaten positiv mit einem Mittelwert von 38,7 (SD=1,5). Bei der Probe mit einem pH-Wert von 10 waren sogar alle Replikate positiv und ergaben im Mittel 36,8 (SD=1,3). Damit lagen sie 1,2 unter dem Mittelwert der Kontrolle. Bei einem pH-Wert von 11 zeigte sich eine noch deutlichere Erniedrigung der Ct-Werte. Der Mittelwert lag dort bei 33,6 (SD=0,03). Allerdings konnte nur in drei Replikaten ein Signal gemessen werden.

Bei 10^3 Bakterien/500 μ l waren drei Replikate der Kontrolle positiv. Im Mittel lagen die Ct-Werte bei 39,0 (SD=0,07). Bei einem pH-Wert von 7,4 war nur eine Messung positiv bei 38,1 (SD=0). Ähnlich verhielt sich die Probe mit einem pH-Wert von 9,5. Hier lag der Wert bei 38,2 (SD=0). Nach Resuspension der Beads in einem pH-Wert von 10 waren sieben von neun Replikaten positiv. Der mittlere Ct-Wert lag bei 38,7 (SD=0,8). Bei pH 11 waren erneut drei Replikate positiv mit einem mittleren Ct-Wert von 34,4 (SD=0,2).

Diese Daten bestätigen zum einen, dass eine mit Resuspension in PBS nach Inkubation von Mtb mit LB-Beads die Detektierbarkeit der DNA herabsetzt, wie schon in Abbildung 15 gezeigt werden konnte. Zum anderen zeigen die Daten, dass durch eine Resuspension der Beads in TE-Puffern mit basischen pH-Werten die Detektierbarkeit der DNA verbessert wird. Ein TE-Puffer mit einem pH-Wert von 10 erschien hierfür optimal. Mit diesem Puffer konnten negative Messergebnisse minimiert und die Ct-Werte verringert werden. Der DNA-Gehalt der Probe war demnach bei einem pH von 10 am höchsten. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Interaktion zwischen freier Mtb-DNA und den Lipobiotin-Beads reduziert werden konnte.

Um zu überprüfen, ob der basische pH-Wert tatsächlich zu einer reduzierten Interaktion zwischen freier DNA und LB-Beads führt, wurde Versuch 3.2.1.1 wiederholt. Zu thermisch isolierter Mtb-DNA wurden H₂O oder LB-Beads hinzugefügt. Allerdings wurden nun sowohl DNA als auch Beads in TE-Puffer (pH 10) resuspendiert. Die Analyse erfolgte über eine qRT-PCR.

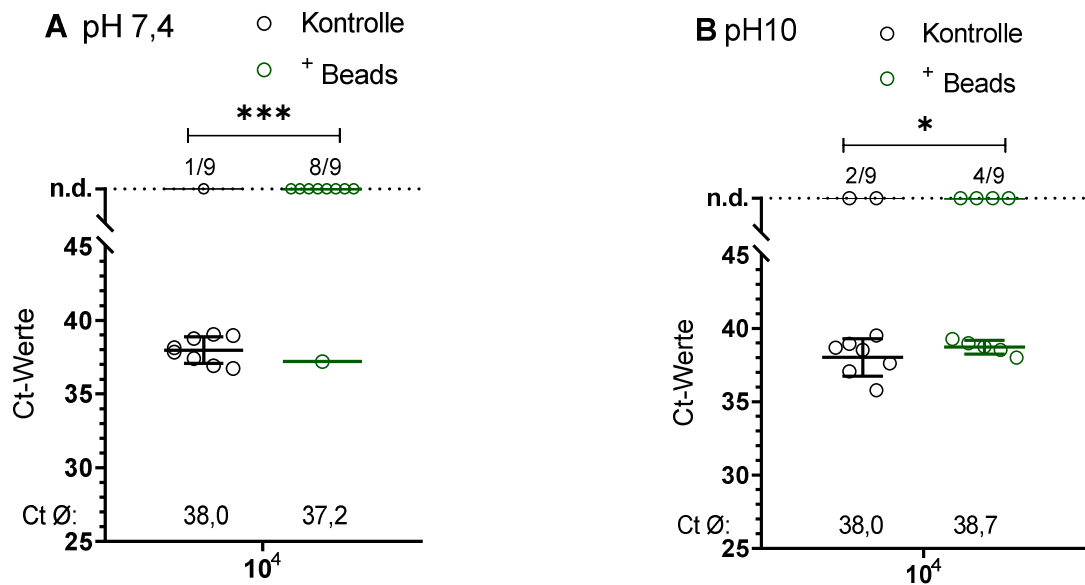


Abbildung 19: Interaktion von thermisch extrahierter Mtb-DNA mit LB-Beads bei einem pH-Wert von 7,4 (A) und 10 (B). A 50µl H37Rv DNA wurden mit 12,5µl H₂O oder Lipobiotin-Beads versetzt. Sowohl Beads als auch die DNA wurden in PBS (pH7) oder TE-Puffer (pH 10) resuspendiert. Die Beads wurden abgetrennt und Proben mittels qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt sind die Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von jeweils einem Experiment mit drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). ANOVA-Test: p=0,00053 (A); p=0,0455 (B).

Abbildung 19A ist ein Auszug aus Abbildung 14, der Abbildung 19B gegenübergestellt wurde. Im ersten Experiment wurde ersichtlich, dass durch eine Inkubation von freier Mtb-DNA mit LB-Beads die Detektierbarkeit von Mtb-DNA abnimmt, was zu häufigeren negativen Messergebnissen in der PCR führt. In Abbildung 19B sind die Ergebnisse des Experimentes bei einem pH-Wert von 10 dargestellt.

Unter diesen Bedingungen lag der Ct-Mittelwert der Kontrolle bei 38,0 (SD=1,3), mit zwei von neun negativen Replikaten. Der mittlere CT-Wert der LB-Beads lag bei 38,7 (SD=0,5) mit vier von neun negativen Replikaten.

Werden diese Ergebnisse mit den vorherigen aus Experiment 3.2.1.1 (Abbildung 19A) verglichen, so zeigt sich, dass die Anzahl der negativen Messergebnisse durch den basischen pH-Wert von lediglich acht auf vier von je neun Messungen verringert werden konnte.

Es ist also möglich, durch einen pH-Wert von 10 die Detektierbarkeit von Mtb-DNA zu verbessern. Dies zeigt, dass durch einen basischen pH-Wert die Interaktion zwischen freier DNA und LB-Beads zwar nicht aufgehoben, aber reduziert werden kann.

3.2.2 Ethanolfällung der DNA

Um die Konzentration der DNA zu erhöhen und damit die Sensitivität zu steigern, wurde versucht, DNA mittels Ethanol-Fällung besser verfügbar zu machen (vgl. Kapitel 2.7). Mit ihr sollte die DNA nicht nur aufgereinigt, sondern auch in ein geringeres Volumen resuspendiert werden können. Damit wäre es möglich, die Mtb-DNA der Proben zu konzentrieren.

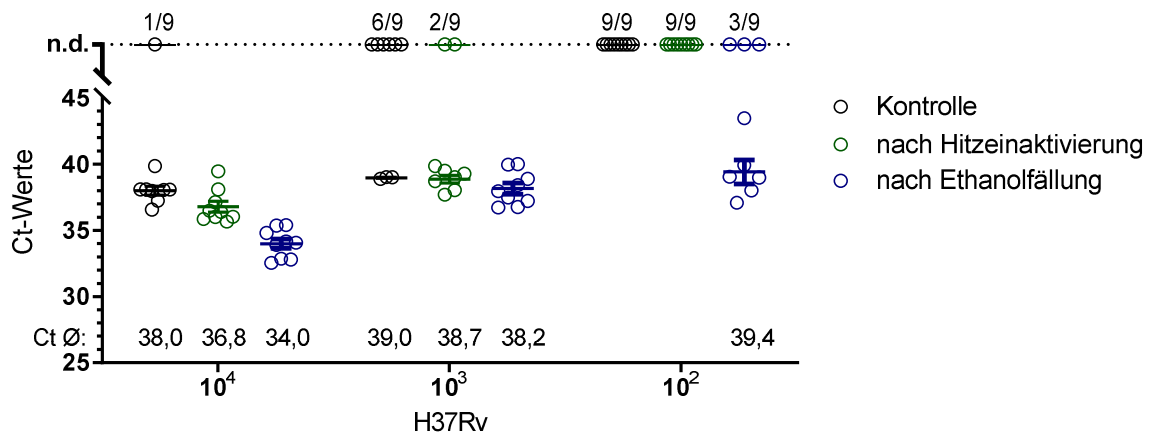


Abbildung 20: Einfluss der DNA-Ethanol-Fällung auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA. Adhäsionsassay von H37Rv mit LB-Beads. Als Kontrolle (schwarz) wurden Mtb in PBS (500µl) verwendet. Beads wurden nach Assay in TE-Puffer (pH10, 100µl) resuspendiert, hitzeinaktiviert und mittels qRT-PCR analysiert (grün). Nach einer DNA-Ethanol-Fällung erfolgte eine zweite Analyse (blau). Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). $p=0,00488$.

Bei $10^4/500\mu\text{l}$ Bakterien lagen die Ct Werte der Kontrolle im Mittel bei 38,0 (SD=0,9). Hierbei waren acht von neun Replikaten positiv. Nach der Inkubation mit LB-Beads und deren Hitzeinaktivierung konnte in allen Replikaten DNA detektiert werden. Im Schnitt lagen die Ct-Werte bei 36,8 (SD=1,3), damit also um 1,2 weniger als in der Kontrolle. Nach der Durchführung der Ethanolfällung waren ebenfalls alle Replikate positiv. Nach der Durchführung des gesamten Verfahrens lag der Ct-Mittelwert nun bei 34,0 (SD=1,1) und war damit um 4 geringer als das Ergebnis der Kontrollen.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit geringeren Konzentrationen erreichen. Bei $10^3/500\mu\text{l}$ Bakterien konnte in der Kontrolle in keinem Replikat Mtb-DNA detektiert werden. Unter diesen Bedingungen ist nur noch ein Drittel der Messwerte positiv und zeigte einen Ct-Mittelwert von 39,0 (SD=0,07). In der Analyse nach der Hitzeinaktivierung waren bei vergleichbarem Ct-Mittelwert von 38,7 (SD=0,8) sieben von neun Replikaten positiv. Ein DNA-Signal in jedem Replikat konnte nach der Ethanolfällung detektiert werden. Der Ct-Mittelwert dieser Probe war am geringsten bei 38,2 (SD=1,3) und hatte die höchste Detektionsrate.

Mit $10^2/500\mu\text{l}$ Bakterien zeigte sich dieses Phänomen sehr deutlich. Sowohl in der Kontrolle als auch nach der Hitzeinaktivierung war in keinem Replikat DNA zu detektieren. Nach Ethanolfällung waren zwei Drittel der Messwerte positiv mit einem mittleren Ct-Wert von 39,4 (SD=2,2).

Damit ist für alle Bakterienkonzentrationen gezeigt worden, dass durch die Ethanolfällung die mittleren Ct-Werte reduziert und signifikant weniger negative Replikate in der PCR gemessen werden konnten als bei Proben nach Hitzeinaktivierung. Bezogen auf die Kontrollen, zeigte sich dieser Effekt noch deutlicher.

Durch die Ethanolfällung war es somit möglich, die Detektierbarkeit von Mtb-DNA in der PCR noch weiter zu steigern. Dies gelang durch eine Anreicherung der Mtb-DNA in einem kleineren Endvolumen von $5\mu\text{l}$.

3.2.3 Variation der Inkubationszeit

Die Inkubationszeit kann ein entscheidender Faktor für die Effektivität der Adhäsion von Mtb an die Lipobiotin-Beads darstellen. In den vorherigen Versuchen wurden Beads und Bakterien eine Stunde inkubiert. Andere Verfahren haben sehr unterschiedliche Inkubationszeiten. Bei den im Jahr 2013 durchgeführten Versuchen, in denen Mtb mit Lipobiotin markiert wurde, betrug die Inkubation mehrere Stunden⁹⁷. Um herauszufinden, welche Inkubationszeit für die Bindung von Mtb an Lipobiotin optimal wäre, wurden verschiedene Zeiten zwischen fünf und 90 Minuten getestet.

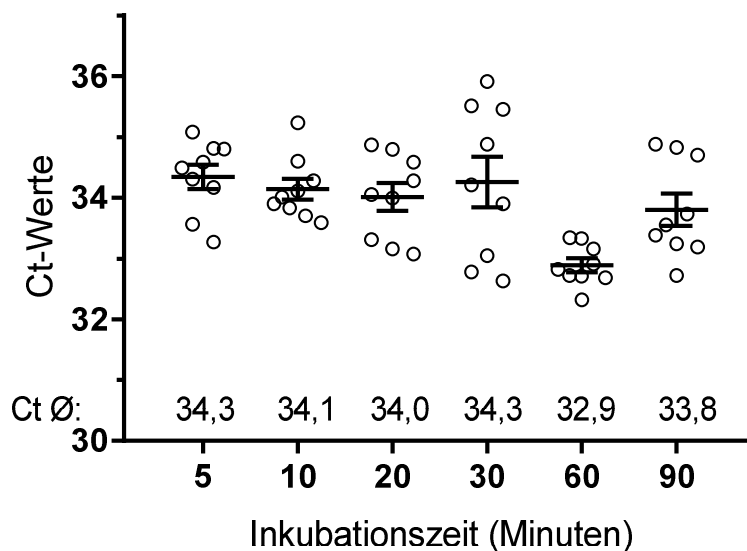


Abbildung 21: Einfluss der Inkubationszeit auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA. Adhäsionsassay von H37Rv mit LB-Beads. Beads wurden nach Assay in TE-Puffer (pH10, 100µl) resuspendiert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. $p=0,088$.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der PCR-Analyse nach verschiedenen Inkubationszeiten von LB-Beads mit Mtb gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass die Ct-Mittelwerte der einzelnen Inkubationszeiten zwischen 34,3 (SD=0,6) und 32,9 (SD=0,3) schwanken und sich damit nur um maximal 1,4 unterscheiden. Dabei war der Mittelwert der 5-minütigen und 30-minütigen Inkubation am größten mit 34,3 (SD=1,3). Der kleinste mittlere Ct-Messwert betrug 32,9 (SD=0,3) und war nach einer 60-minütigen Inkubation detektierbar. Die Unterschiede der Mittelwerte waren somit gering. Wird der Standardfehler (SEM) einbezogen, so zeigte sich nach der einstündigen Inkubation der kleinste SEM mit 0,11. Bei der Inkubation über 30 Minuten war er mit 0,42 am größten. Die mittleren Ct-Messwerte und SEM für 10, 20 und 90 Minuten lagen dazwischen.

Da die Ergebnisse nach einer einstündigen Inkubation im Vergleich zu längeren und kürzeren Inkubationszeiten den geringsten Ct-Wert und die niedrigsten SEM aufwiesen,

schien dies die optimalen Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens zu sein. Die folgenden Versuche wurden unverändert mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten durchgeführt.

3.2.4 Mehrmalige Inkubation und Variation der Anzahl der LB-Beads

Eine weitere Möglichkeit, den Adhäsionsassay zu optimieren, ist die Anzahl der eingesetzten Beads zu variieren. Hierbei kann entweder in einem Inkubationsschritt eine höhere Anzahl der beschichteten Beads eingesetzt werden, oder es können mehrere Inkubationsschritte mit der gleichen Anzahl der Beads aufeinander folgen. Die Ergebnisse beider Verfahren könnten dann einen Aufschluss darüber geben, ob die gewählte Menge der LB-Beads ausreichend für eine optimale Bindung von Mtb an die Beads ist und ob die Bindung besser durch ein Gleichgewicht beschrieben wird, indem mehr Mykobakterien aus der Lösung gebunden werden können, wenn mehrere Inkubationsschritte aufeinander folgen. Dies sollte im folgenden Experiment untersucht werden, indem die Menge der verbleibenden Mtb-DNA im Überstand zwischen einer dreimaligen Inkubation mit jeweils 25µl LB-Beads ($4,7 \cdot 10^6$ Beads) und einer einmaligen Inkubation von 75µl LB-Beads ($1,41 \cdot 10^7$ Beads) verglichen wurde.

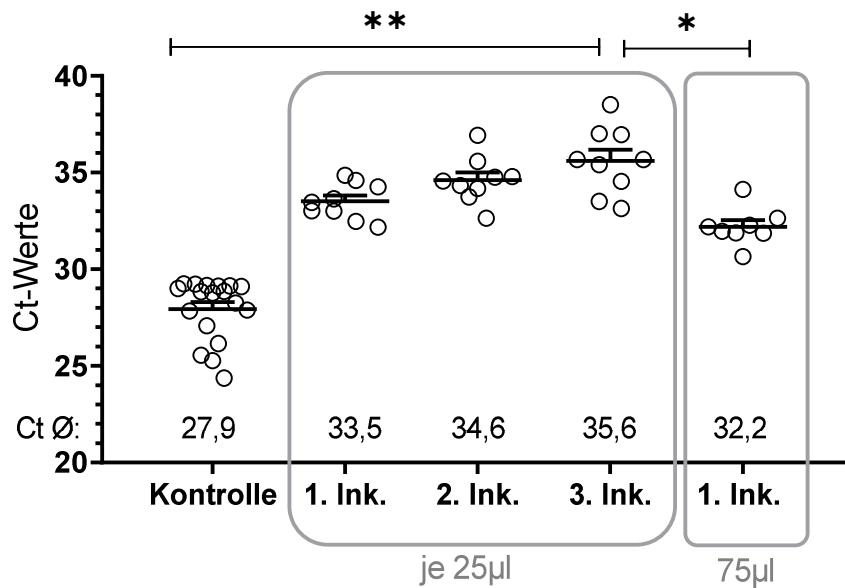


Abbildung 22: Mehrmalige Inkubation von Mtb mit LB-Beads. LB-Beads ($4,7 \cdot 10^6$ Beads, $25,0 \mu\text{l}$) wurden in PBS mit Mtb H37Rv (10^6) inkubiert und anschließend mit zwei Magneten isoliert. Die Inkubation wurde zweimal wiederholt. In einer anderen Probe wurde Mtb H37Rv (10^6) mit LB-Beads ($1,41 \cdot 10^7$ Beads, $75,0 \mu\text{l}$) inkubiert und mit zwei Magneten isoliert. Nach der Hitzeinaktivierung erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR. Kontrolle: 10^6 Mtb/ $500 \mu\text{l}$ PBS. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei bis sechs unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. $p=0,0012$; $p=0,023$.

Die Kontrolle wies einen mittleren Ct-Wert von 27,9 (SD=1,6) auf. Dem gegenüber stehen die mittleren Ct-Werte nach Durchführung des Adhäsionsassays. Nach der ersten Inkubation betrug er 33,5 (SD=0,9), nach der zweiten 34,6 (SD=1,2) und nach den dritten sogar 35,6 (SD=1,7). Nach einer Inkubation von $75 \mu\text{l}$ LB-Beads ergab sich ein Messwert von 32,2 (SD=1,0).

Damit lagen die Ct-Werte nach den jeweiligen Inkubationen über denen der Kontrolle. Wurden die Messwerte der Kontrolle und der dritten Inkubation mit $25 \mu\text{l}$ Beads betrachtet, ergab sich ein Anstieg von 7,7. Nach einer Inkubation mit $75 \mu\text{l}$ Beads betrug diese Differenz allerdings nur 4,3. Es war somit entscheidend, ob die Proben einmalig mit einer bestimmten Menge an Beads inkubiert wurden, oder ob die gleiche Menge Beads in mehreren Inkubationsschritten eingesetzt wurde. Erkennbar ist, dass nach mehrmaliger Inkubation weniger Mtb-DNA in der PCR in den Überständen detektiert werden konnte als nach einer einmaligen Inkubation mit der gleichen Menge an Beads. Dies lässt im Umkehrschluss die Vermutung zu, dass mehr Bakterien an die Beads gebunden und extrahiert werden können, wenn die Inkubation wiederholt wird.

Ergebnisse 3.2: Zusammenfassung

- Die Inkubation freier Mtb DNA mit LB-Beads führte zu höheren Ct-Werten in der PCR und einer verminderten Detektion der Mtb DNA. Dies war mit unfunktionalisierten Beads nicht zu beobachten.
- Die Interaktion fand zwischen der freien Mtb DNA und der Lipobiotin-Beschichtung der Beads statt.
- Die Verwendung eines basischen Puffers reduzierte die Interaktion. Ein pH-Wert von 10 war ideal.
- Durch die Ethanolfällung konnte Mtb DNA angereichert und deren Detektierbarkeit gesteigert werden.
- Eine Inkubationszeit von 60 Minuten erzielte die besten Ergebnisse zur Anlagerung von Mtb an LB-Beads.
- Nach einer wiederholten Inkubation mit LB-Beads war weniger DNA im Überstand detektierbar als bei einer einmaligen Inkubation mit gleicher Menge LB-Beads.

3.3 Adhäsionsassay in Speichelproben

3.3.1 Adhäsionsassay in mit Mtb versetzten Speichelproben

3.3.1.1 Verminderung der Viskosität von Speichelproben

Da in Kapitel 3.2.2 gezeigt wurde, dass nach Durchführung der neuen Methodik Mtb-DNA angereichert werden kann, wurde dies anschließend in Speichelproben von gesunden Probanden/-innen getestet, die mit Mtb versetzt wurden. Bei der Verarbeitung der Speichelproben zeigte sich, dass einige zu viskös und inhomogen waren, um kleine Volumina exakt zu pipettieren.

Proteinase K wird standardmäßig beim Mäuseschwanzverdau verwendet, um bspw. DNA zu isolieren^{105,106}. DTT spaltet Disulfidbrücken auf¹⁰⁷. Um zu testen, ob die Reagenzien die Viskosität der Speichelproben verringern, wurden diese für 45 Minuten mit beiden Reagenzien inkubiert (vgl. Kapitel 2.14). Die Viskosität konnte so deutlich reduziert werden. Die Proben waren nach der Behandlung homogen und einwandfrei pipettierbar.

3.3.1.2 Rheologie der Speichelproben nach Proteinase K- und DTT-Behandlung

Um die Viskositätsreduktion durch die Behandlung der Speichelproben mit Proteinase K und DTT zu objektivieren, wurden fünf Speichelproben in der Abteilung „Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Frau Prof. Dr. Scherließ mittels Rheometer getestet. Dabei wurde eine Messung an einer Speichelprobe vor Inkubation mit Proteinase K und DTT und eine Messung nach der Inkubation durchgeführt.

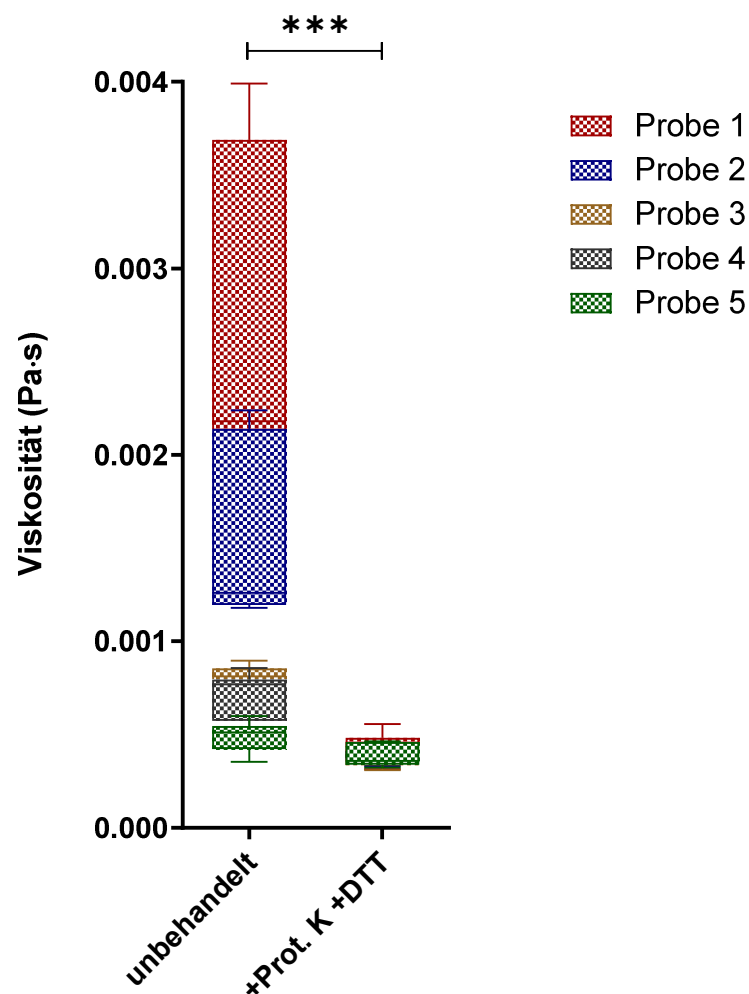


Abbildung 23: Einfluss der Inkubation mit Proteinase K und DTT auf die Rheologie der Speichelproben. Humane Speichelproben wurden entweder ohne Inkubation (unbehandelt) oder nach Inkubation für 45 Minuten mit Proteinase K und DTT (+Prot. K +DTT) gemessen. Dargestellt sind Viskosität in Pa·s, Mittelwert $\pm$ SEM der fünf Speichelproben mit jeweils drei Replikaten. Wilcoxon-Vorzeichen-Rand-Test: $p=0,0001$.

Die Ergebnisse des Experimentes in Abbildung 23 finden sich zusammengefasst in Tabelle 8.

Tabelle 8: Ergebnisse aus Abbildung 23.

	Viskosität vor der Behandlung, Mittelwert in $\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot 10^{-4}$ ($\text{SD}\cdot 10^{-5}$)	Viskosität nach der Behandlung, Mittelwert in $\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot 10^{-4}$ ($\text{SD}\cdot 10^{-5}$)	Faktor der Viskositäts-reduktion (%)
Probe 1	26,24 (SD=38,612)	4,26 (SD=7,7)	83,76
Probe 2	16,18 (SD=48,94)	3,85 (SD=2,92)	76,21
Probe 3	8,14 (SD=4,998)	3,82 (SD=4,47)	53,07
Probe 4	7,19 (SD=12,36)	3,97 (SD=3,23)	44,78
Probe 5	4,93 (SD=7,243)	3,86 (SD=5,9)	21,70

Durch Proteinase K und DTT konnte nicht nur die Viskosität in allen Proben vermindert werden, auch der Standardfehler konnte durch die Inkubation reduziert werden, was für eine Homogenisierung der Speichelzusammensetzung spricht.

3.3.1.3 Einfluss von Proteinase K und DTT auf Mtb und Begleitflora

Bevor Proteinase K und DTT als fester Bestandteil des Assays etabliert werden kann, muss untersucht werden, ob die Substanzen einen Einfluss auf die Vitalität von Mtb oder die orale Begleitflora hat. Dies wurde zuerst mit Mtb in PBS und anschließend mit Speichel gesunder Probanden/-innen untersucht. Mtb für 45 Minuten entweder mit bidestilliertem Wasser oder Proteinase K und DTT inkubiert und anschließend ausplattiert.

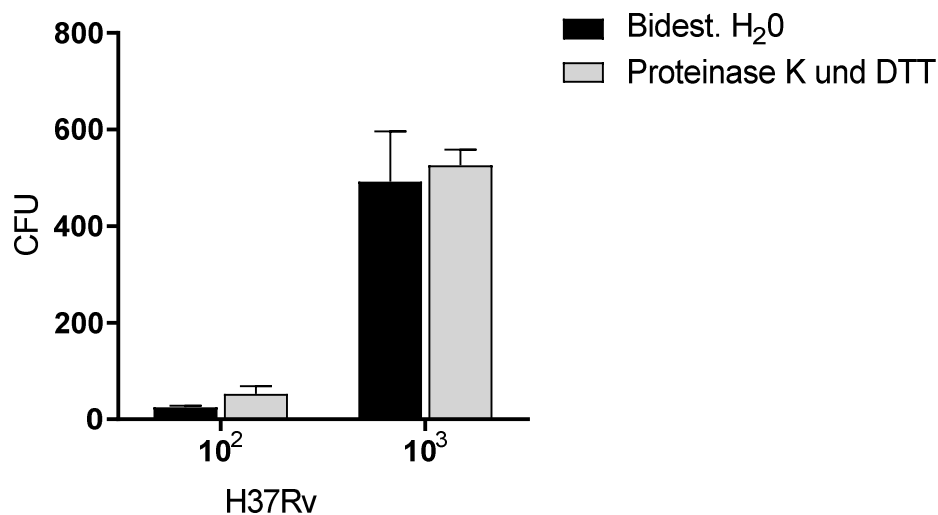


Abbildung 24: Einfluss der Inkubation mit Proteinase K und DTT auf das Wachstum von Mtb. H37Rv wurde entweder mit H₂O (schwarz) oder Proteinase K und DTT (grau) versetzt und für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf 7H10 Platten ausplattiert. Dargestellt sind CFU +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. $p=0,819$.

In Abbildung 24 wurde der Einfluss von beiden Reagenzien auf Mtb dargestellt. Bei 10² Keimen lag Mittelwert der vorbehandelten Proben bei 53 Kolonien (SD=28,2) verglichen 25 Kolonien (SD=6,4) in der Kontrolle. Bei 10³ Bakterien lag der Mittelwert nach der Vorbehandlung bei 526 Kolonien (SD=56,8), ohne Vorbehandlung bei 492 Kolonien (SD=180,4) Statistisch war kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Es zeigte sich, dass sich, dass die Wachstumsraten mit und ohne Zugabe von Proteinase K und DTT vergleichbar waren. Somit konnte diese Vorbehandlung zur Reduzierung der Viskosität verwendet werden, ohne die Vitalität der Mykobakterien in Speichelproben zu beeinflussen.

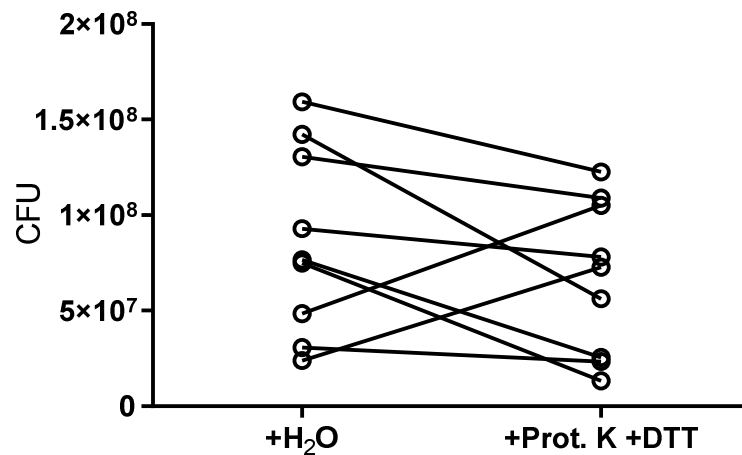


Abbildung 25: Einfluss der Inkubation von Proteinase K und DTT auf das Wachstum oraler Begleitflora. Speichelproben wurden entweder mit H₂O oder Proteinase K und DTT versetzt und für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Blutagarplatten ausplattiert. Dargestellt sind CFU +/- SEM von neun unabhängigen Experimenten. Abhängiger t-Test: p=0,258.

Abbildung 25 zeigt den Einfluss von Proteinase K und DTT auf die Mikroorganismen in Speichel. Die mittlere Anzahl der gewachsenen Kolonien lag in der Kontrolle bei $8,7 \cdot 10^7$ Kolonien ($SD=4,9 \cdot 10^7$). Nach Vorbehandlung den beiden Substanzen lag der Wert nur noch bei $6,7 \cdot 10^7$ Kolonien ($SD=4,0 \cdot 10^7$). Dies entsprach einer Reduktion um 23%.

Wurden allerdings die Speichelproben jeweils einer Person betrachtet, so zeigte sich, dass sieben von neun Proben tatsächlich eine Reduktion der Kolonien erfuhren. In zwei Speichelproben nahm die Anzahl der Kolonien nach einer Inkubation mit Proteinase K und DTT allerdings zu, einmal um 217% und einmal um 304%.

Somit wuchsen nach der Behandlung der Speichelproben teilweise mehr, teilweise weniger Kolonien auf den Platten als in der Kontrolle. Dies lässt die Vermutung zu, dass Proteinase K und DTT zu einer verminderten Vitalität der im Speichel befindlichen Mikroorganismen führen oder aber durch die Störung des mikrobiellen Gleichgewichts mit konsekutivem Selektionsvorteil das Wachstum einzelner Bakterien fördern kann.

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Streuung zwischen den verschiedenen Proben in den einzelnen Bedingungen sehr groß ist. Insgesamt wurden neun Speichelproben von neun unterschiedlichen Spendern untersucht. Die Streuung könnte durch die individuelle Besiedelung der Mundhöhle zu erklären sein. Außerdem spielen auch andere Faktoren, wie beispielsweise die Zahnhygiene und der Zeitpunkt der letzten Mahlzeit eine Rolle. Diese Faktoren sind bei der Sammlung der Speichelproben nicht berücksichtigt worden.

Während Mtb nach der Vorbehandlung keine verminderte Anzahl der Kolonien zeigte, wird das Wachstum anderer Bakterien der Mundhöhle teilweise gehemmt und teilweise gefördert. Ein statistisch signifikanter Trend ergab sich nicht.

Ergebnisse 3.3.1: Zusammenfassung

- Die Inkubation mit Proteinase K und DTT verminderte die Viskosität der Speichelproben signifikant.
- Die Inkubation mit Proteinase K und DTT hatte keinen Einfluss auf die Vitalität von *M. tuberculosis*.
- Die Inkubation mit Proteinase K und DTT reduzierte das Wachstum von Bakterien der oralen Flora in einigen Proben. Teilweise wurde das Wachstum auch gefördert.

3.3.2 Assay in Speichelproben nach Zugabe von Mtb

Nachdem in Abbildung 24 gezeigt wurde, dass Behandlung der Speichelproben mit Proteinase K und DTT keinen Effekt auf die Vitalität von Mtb hat, wurde der Assay nun mit Speichelproben von gesunden Probanden/-innen getestet, zu denen verschiedene Mengen Mtb hinzugefügt wurden. Es wurden zu den Speichelproben (5ml) zwischen 10^5 - 10^2 Bakterien hinzugegeben. Anschließend wurde der Assay durchgeführt und die Proben mittels qRT-PCR analysiert

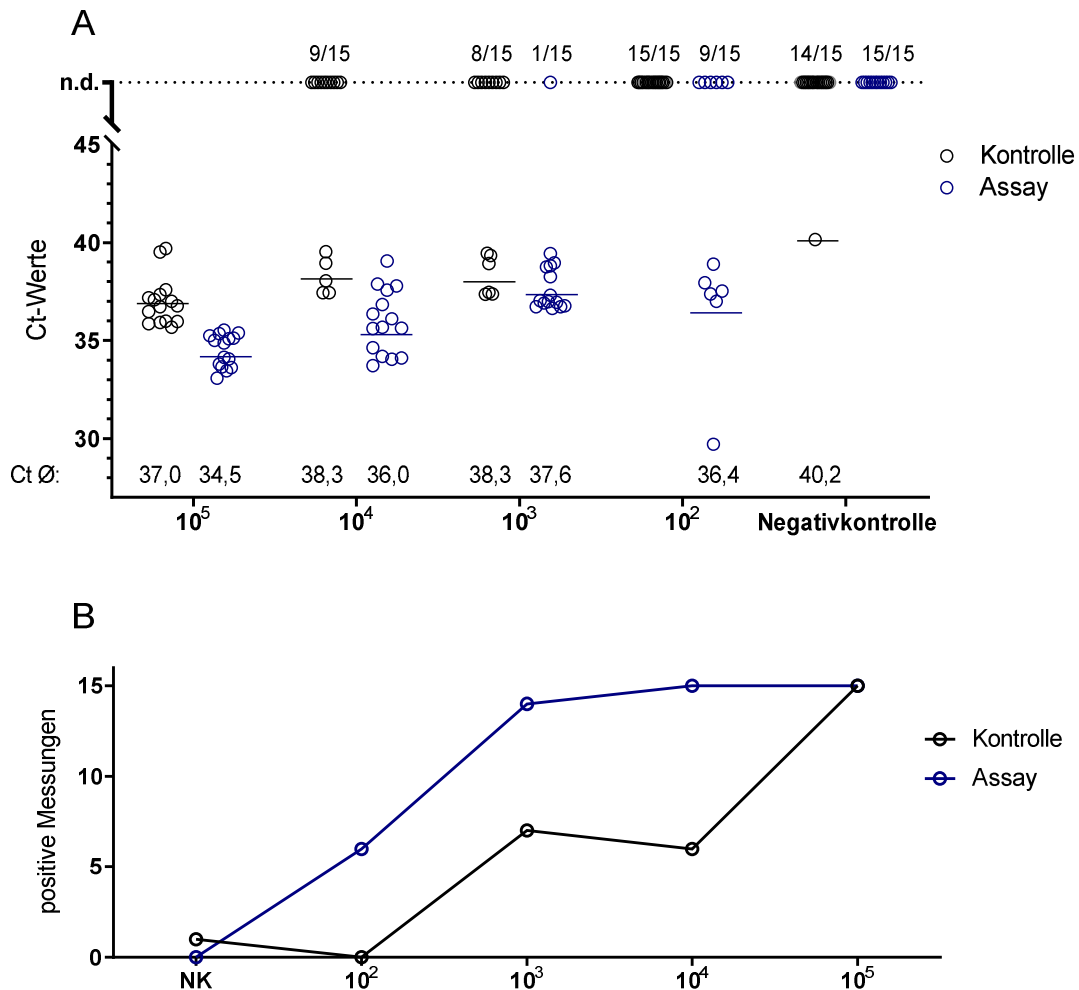


Abbildung 26: Assay mit Speichelproben von gesunden Probanden/-innen, die mit Mtb versetzt worden sind. **A:** Zu 5ml Speichelproben wurden verschiedene Mengen H37Rv gegeben und mit Proteinase K und DTT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Assay mit LB-Beads durchgeführt. Analyse erfolgte vor (schwarz) und nach dem Verfahren (blau). **B:** Anzahl der Messwerte, bei denen Mtb-DNA gemessen werden konnte. Proben wurden mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von fünf unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. (n.d.: keine DNA detektierbar). $p = 0,0000021$.

Tabelle 9: Ergebnisse aus Abbildung 26.

	Kontrolle		Assay	
Bakterienkonzentration, [Anzahl/5ml]	Positive Replikate, Anzahl (%)	Ct-Werte, Mittelwert (SD)	Positive Replikate, Anzahl (%)	Ct-Werte, Mittelwert (SD)
10^5	15 (100%)	37,0 (1,2)	15 (100%)	34,5 (0,8)
10^4	6 (40%)	38,3 (0,9)	15 (100%)	36,0 (1,6)
10^3	7 (47%)	38,3 (1,0)	14 (93%)	37,6 (1,0)
10^2	0 (0%)	n.d.	8 (40%)	36,4 (1,0)
Negativkontrolle	1 (7%)	40,2 (0)	0 (0%)	n.d.

Die Ergebnisse aus Abbildung 26A und B werden in der Tabelle 9 aufgelistet. Bei Speichelproben, die mit Mtb versetzt wurden, konnten mehr Proben positiv getestet und eine Reduktion des mittleren Ct-Wertes erreicht werden. Dies bedeutet, dass die Detektierbarkeit von Mtb-DNA in Speichelproben durch das Verfahren signifikant erhöht werden konnte, was durch eine Anreicherung der DNA erklärbar ist. Die Detektionsgrenze lag zwischen 10^3 und 10^2 Bakterien in 5ml Speichel. Der einzelne positive Messwert der Negativkontrolle ist am ehesten mit einer DNA-Kontamination zu erklären.

Ergebnisse 3.3.2: Zusammenfassung

- Durch das Verfahren konnte Mtb DNA angereichert und deren Detektierbarkeit in Speichelproben gesteigert werden.
- Das Detektionslimit lag zwischen 100 - 1000 Bakterien in 5ml Speichel.

3.3.3 CFU Analyse des Assays in mit Mtb versetzten Speichelproben

3.3.3.1 Wirkung von Amphotericin B und Penicillin G auf Mtb und orale Mundflora

Da mittels PCR zugesetzte Mtb in Speichelproben nachgewiesen werden konnten (vgl. Kapitel 3.3.2), sollte dies nun auch in einem unabhängigen Verfahren mittels CFU-Analyse gezeigt werden. Speichel kann nicht unbehandelt auf die 7H10 Agarplatten gegeben werden, da nicht nur Mtb, sondern auch die Mundflora Kolonien bilden würde und damit eine eindeutige Auszählung unmöglich wäre. Um dies zu verhindern, wurden 7H10-Platten mit dem Antibiotikum Penicillin G und dem Antimykotikum Amphotericin B versetzt.

Bevor die mit Mtb versetzten Speichelproben ausplattiert wurden, sollte in zwei Vorexperimenten gezeigt werden, dass die Medikamente zwar die orale Begleitflora reduzieren, das Wachstum von Mtb jedoch nicht beeinträchtigen. Um dies zu testen, wurde zuerst Mtb und anschließend Speichelproben von gesunden Probanden/-innen auf Nährböden ausplattiert, von denen die Hälfte mit den Medikamenten versetzt worden waren.

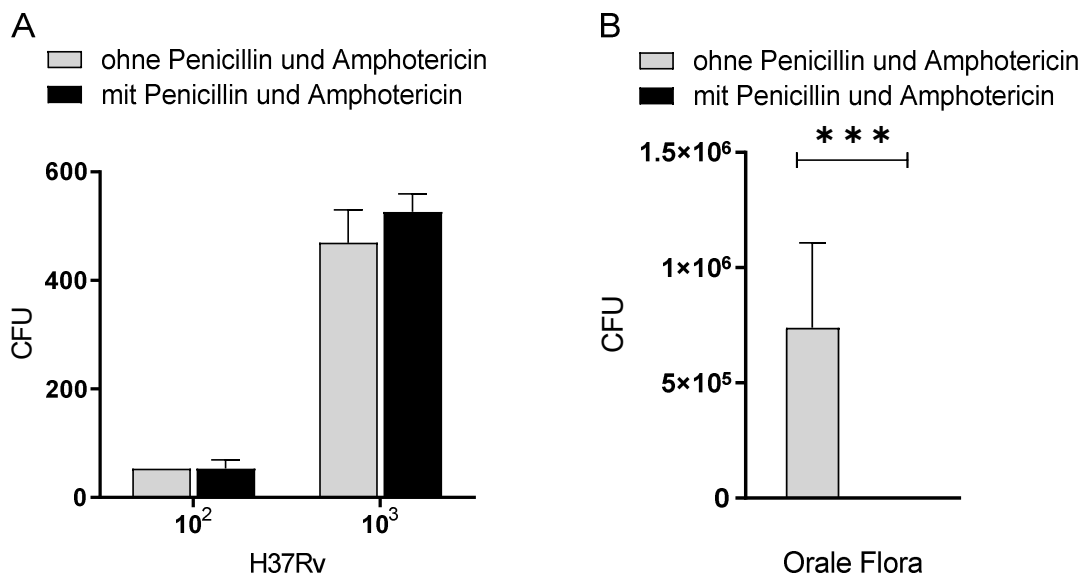


Abbildung 27: Einfluss von Penicillin G und Amphotericin B auf das Wachstum von Mtb (A) und oraler Begleitflora in Speichelproben (B). H37Rv (A) und Speichelproben (B) wurden mit Proteinase K und DTT versetzt und für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf 7H10 Platten mit und ohne Penicillin G und Amphotericin B ausplattiert. Dargestellt sind CFU $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten. ANOVA-Test: $p=0,317$ (A); $p=0,000000203$ (B).

Bevor die Keime ausplattiert wurden, wurde eine Inkubation mit Proteinase K und DTT durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.1.1), um die Bedingungen in Speichelproben zu simulieren.

In Abbildung 27A ergaben für 10^2 Bakterien beide Proben den gleichen Mittelwert, nämlich 53 Kolonien (SD=26,2).

Bei 10^3 Bakterien lag der Mittelwert der Proben auf unbehandelten 7H10 Platten 526 Kolonien (SD=56,8), auf medizierten Platten bei 469 Kolonien (SD=104,9). Penicillin G und Amphotericin B hatten somit keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von Mtb.

In Abbildung 27B lag der Mittelwert der Kolonien der oralen Begleitflora auf unbehandelten 7H10-Böden bei $7,4 \cdot 10^5$ Kolonien (SD= $6,4 \cdot 10^5$). Die gleichen Speichelproben zeigten auf medizierten Nährböden kein bakterielles Wachstum. Andere Mikroorganismen, wie beispielsweise Pilze, konnten ebenfalls nicht detektiert werden.

Daraus kann geschlossen werden, dass Penicillin G und Amphotericin B ein effektives Mittel sind, um das Wachstum der oralen Flora zu unterbinden.

3.3.3.2 Kolonie formende Einheiten (CFU) nach Adhäsionsassay in Speichel

Um zu analysieren, ob der Assay nicht nur Mtb-DNA in Speichelproben anreichern kann, sondern auch vitale Bakterien, wurden Speichelproben von gesunden Probanden/-innen mit verschiedenen Mengen an mCherry-Tuberkulose-Bakterien versetzt und anschließend der Assay durchgeführt. Vor der Hitzeinaktivierung wurden die Proben auf Nährböden mit Amphotericin B und Penicillin G ausgebracht. Nach der Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt. Die mCherry-Tb-Bakterien bildeten rötliche Kolonien, sodass sie gut von anderen Kolonien unterschieden werden können.

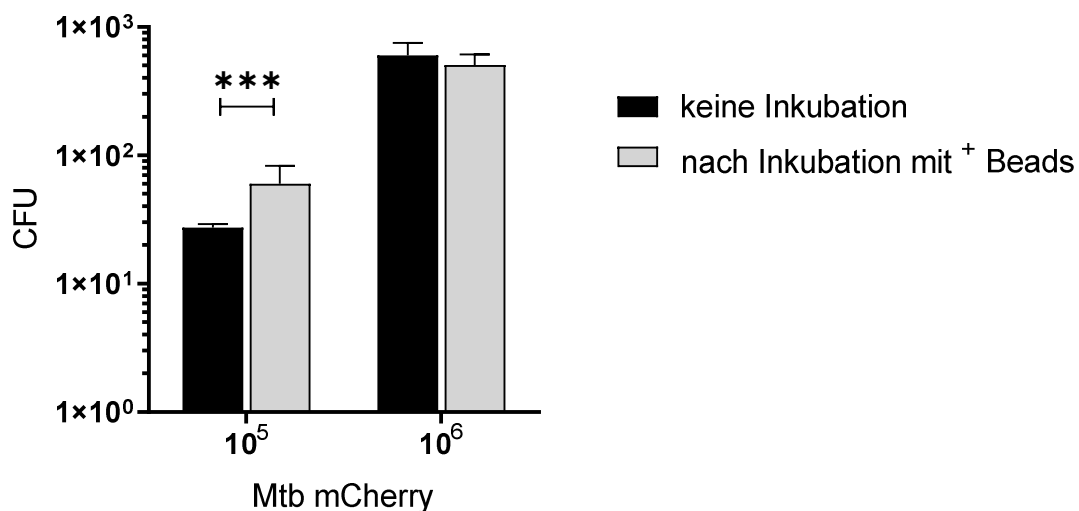


Abbildung 28: CFU Analyse nach Durchführung des Assays in mit Mtb versetzten Speichelproben. Speichelproben wurden mit 10^5 bzw. 10^6 mCherry Mtb versetzt. Proteinase K und DTT wurden hinzugefügt und alle Proben für 45 Minuten inkubiert. Es wurden die Proben zum ersten Mal plattiert (schwarz; 100µl) und nach einer Inkubation mit LB-Beads wurden die Proben mit den Beads ein zweites Mal auf mit Penicillin G und Amphotericin B versetzten 7H10-Nährböden plattiert (grau; 100µl). Dargestellt sind FU +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. ANOVA-Test: $p=0,0006$.

Bei einer zugegebenen Menge von 10^5 Bakterien wuchsen ohne eine Inkubation mit LB-Beads durchschnittlich etwa 27 Kolonien ($SD=3,1$). Nach einer Inkubation mit LB-Beads wuchsen signifikant mehr Kolonien, im Mittel 60 Kolonien ($SD=40$).

Bei 10^6 Bakterien war der Effekt nicht zu sehen. Dort waren ohne LB-Beads durchschnittlich 600 Kolonien ($SD=264,6$) zählbar, mit LB-Beads 507 Kolonien ($SD=181,5$). Der Unterschied war nicht signifikant.

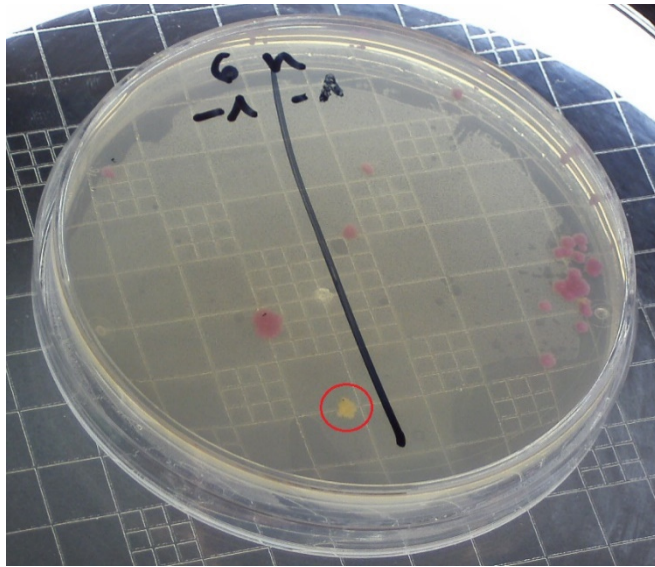


Abbildung 29: Nährboden mit mehreren rötlichen Kolonien des mCherry-Mtb-Stammes und eine weißliche Kolonie (rote Umrandung).

Gleichzeitig wuchsen auf einigen der Platten nicht nur rötliche Kolonien des verwendeten mCherry-Stammes, vereinzelt bildeten sich auch weißliche Kolonien (vgl. Abbildung 29) aus. Dies lässt die Vermutung zu, dass anders als in Kapitel 3.3.3.1 gezeigt, nicht alle, sondern nur ein Großteil der mikrobiellen Begleitflora abgetötet wurden.

Ergebnisse 3.3.3: Zusammenfassung

- Penicillin G und Amphotericin B verhinderten weitgehend das Wachstum von Mikroorganismen des Speichels auf 7H10 Platten.
- Das Wachstum von Mtb wurde von diesen antimikrobiellen Substanzen nicht signifikant reduziert.
- Durch die Inkubation der Speichelproben mit LB-Beads war es möglich Mtb signifikant anzureichern.

3.3.4 Verblindete Testung von Patientenproben

Mit dem entwickelten Verfahren konnte Mtb erfolgreich in Speichelproben detektiert werden, denen verschiedene Konzentrationen Mtb zugesetzt worden waren (vgl. Kapitel 3.3.2). Die Frage, ob mit der Methode auch Mtb aus Speichel von Patienten/-innen mit aktiver pulmonaler Tuberkulose nachgewiesen werden kann, wurde im nächsten Experiment adressiert. Hierzu wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils zehn Speichelproben von gesunden Probanden/-innen mit zehn Speichelproben von Patienten verblindet getestet. Die Ergebnisse des ersten Versuchs sind in Abbildung 30 abgebildet, in Abbildung 31 sind die Ergebnisse des zweiten Versuchs zu finden.

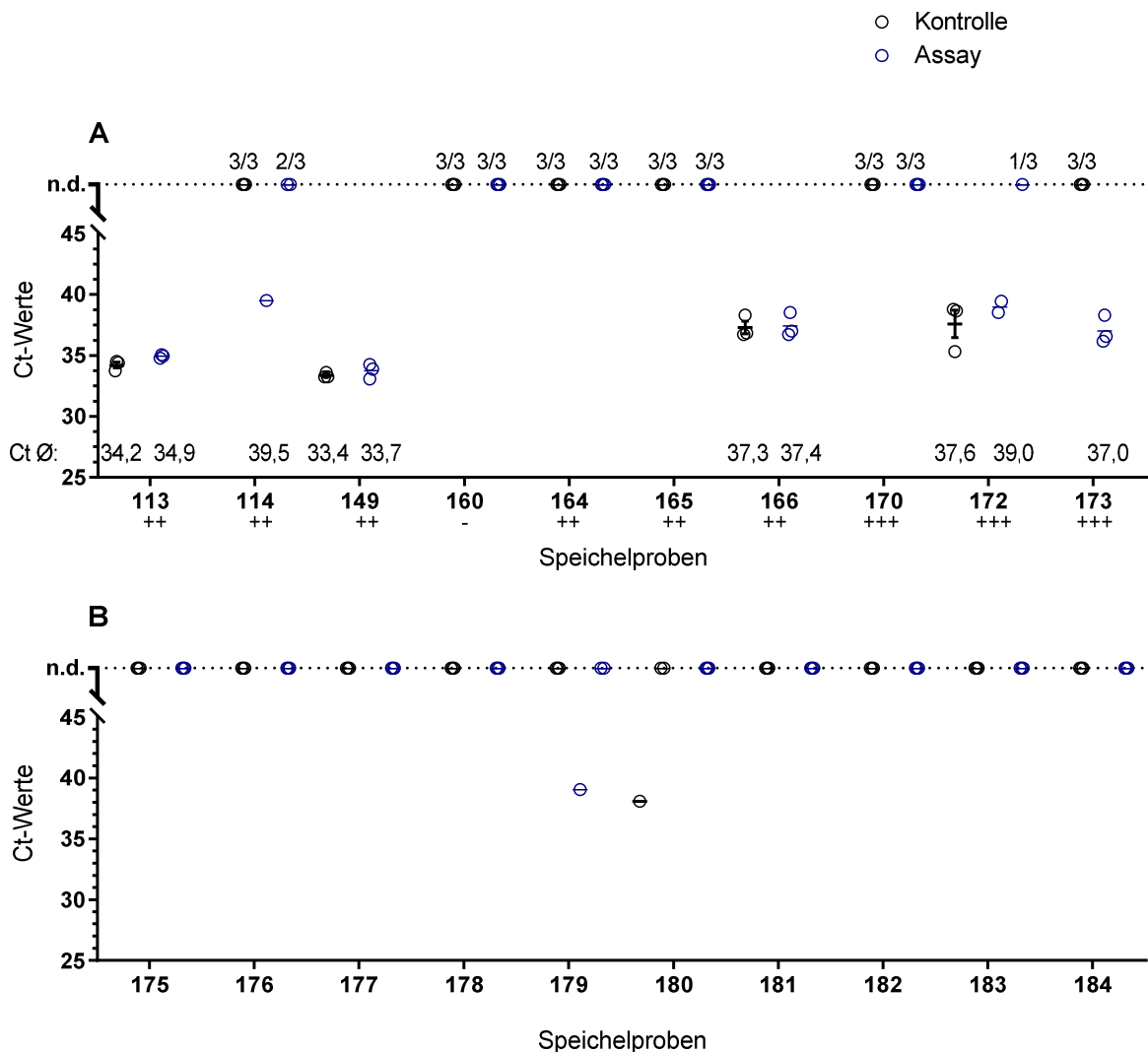


Abbildung 30: Erster Satz des Assays mit verblindeten Speichelproben. Proben von Tb-Patienten/-innen (A) und gesunden Probanden/-innen (B). In Speichelproben wurde der Assay mit LB-Beads durchgeführt. Analyse erfolgte vor (schwarz) und nach dem Verfahren (blau). Proben wurden mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei technischen Replikaten. Ergebnisse der ZN-Färbung unter Probennummern, falls vorhanden (vgl. Tabelle 7). ANOVA-Test für (A): $p=0,631$.

Wie in Abbildung 30A dargestellt, wiesen in der Kontrolle (vor dem Assay) vier Speichelproben (Nr. 113, 149, 166, 172) drei positive Replikate auf. Die anderen sechs Proben zeigten kein Signal in der PCR.

Nachdem das Verfahren durchgeführt wurde, waren ebenfalls vier Speichelproben (Nr. 113, 149, 166, 173) in allen Replikaten positiv. Bei Nr. 172 konnte nur in zwei Replikaten DNA detektiert werden und in Probe Nr. 114 nur ein Replikat. In vier Proben konnte auch nach dem Assay kein Signal gemessen werden. Hieraus wird ersichtlich, dass nur eine Probe durch die Durchführung des Assays verstärkt detektiert werden konnte, nämlich Probe Nr. 137. Bei dieser Probe wurden in der Kontrolle keine DNA detektiert, nach Durchführung des Assays waren alle Replikate bei einem mittleren Ct-Wert von 37 (SD=1,1) positiv.

Im Hinblick auf die restlichen Mittelwerte und unter Zunahme der statistischen Auswertung zeigt sich, dass keine Reduktion der mittleren Ct-Werte und kein signifikanter Effekt durch den Assay erzielt werden konnte.

In Abbildung 31B sind die Ergebnisse der gesunden Probanden/-innen dargestellt. Insgesamt waren ca. 97% der Messergebnisse negativ. Ein Replikat der Speichelprobe Nr. 179 war nach der Prozessierung positiv, ein weiteres Replikat war in der Kontrolle der Probe Nr. 180 positiv. Leider konnten nicht erneut Speichelproben von den Probanden/-innen gesammelt und erneut analysiert werden.

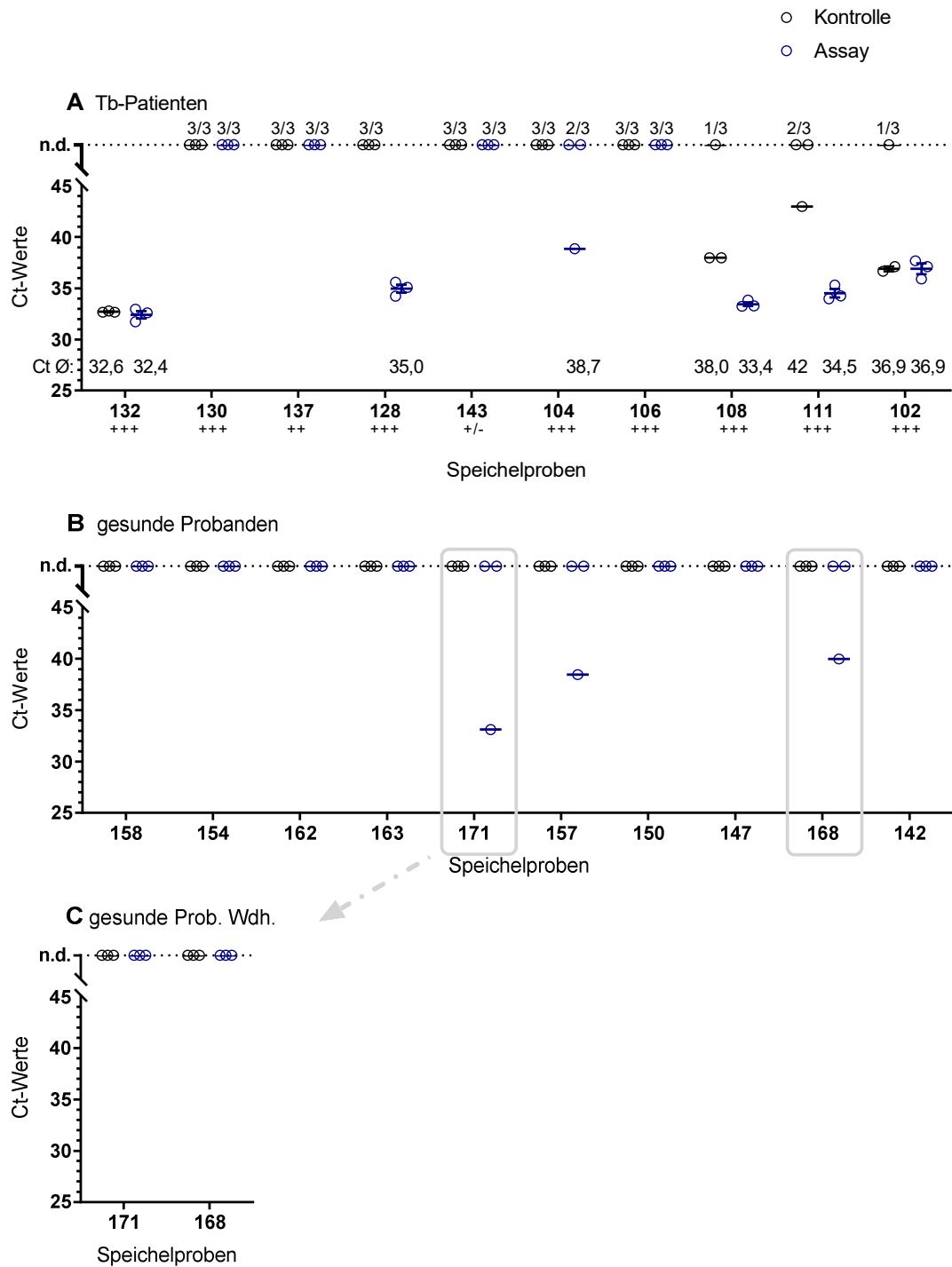


Abbildung 31: Zweiter Satz des Assays mit verblindeten Speichelproben. Proben von TB-Patienten/-innen (A), gesunden Probanden/-innen (B) und eine Wiederholung von zwei Speichelproben der gesunden Probanden/-innen (C). In Speichelproben wurde der Assay mit LB-Beads durchgeführt. Analyse erfolgte vor (schwarz) und nach dem Verfahren (blau). Proben wurden mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind Ct-Werte, Mittelwert $\pm$ SEM von drei technischen Replikaten. Ergebnisse der ZN-Färbung unter Probennummern, falls vorhanden (vgl. Tabelle 7). (n.d.: keine DNA detektierbar). ANOVA-Test für (A): $p=0,0143$.

Bei Proben von Tb-Patienten/-innen (Abbildung 31A) zeigte sich, dass ohne Assay nur eine Speichelprobe (Nr. 132) drei positive Replikate aufwies. In Speichelprobe Nr. 108 und Nr. 102 waren zwei Replikate vor Durchführung des Assays positiv und bei Nr. 111 eines. Sechs Proben zeigten kein Signal in der PCR.

Nach dem Assay fand sich in fünf Speichelproben (Nr. 132, Nr. 128, Nr. 108, Nr. 111, Nr. 102) ein positives Signal in allen drei Replikaten. Bei Nr. 104 konnte nur in einem Replikat DNA detektiert werden. In vier Proben konnte auch nach dem Assay kein Signal gemessen werden. Nur in Probe Nr. 132 konnte keine Verringerung des mittleren Ct-Wertes durch das Verfahren erreicht werden. Bei den anderen positiven Proben konnte zum einen die Zahl der negativen Replikate verringert werden, zum anderen zeigt sich dort aber auch eine Verminderung der mittleren Ct-Werte. Statistisch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kontrolle und denen nach Durchführung des Assays nachgewiesen werden.

In Abbildung 31B ist dargestellt, dass alle Replikate der Speichelproben von gesunden Probanden/-innen vor dem Assay negativ waren. Nach Durchführung aller Schritte war in drei Speichelproben (Nr. 171, Nr. 157, Nr. 168) jeweils ein Replikat positiv, dort wurde also Mtb-DNA detektiert. Die Ct-Werte lagen dabei zwischen 33,1 (SD=0) und 40 (SD=0). Somit sind 95% aller Replikate negativ und 5% positiv. Da es sich um gesunde Spender handelte, lagen vermutlich falsch positive Ergebnisse vor, die erneut überprüft wurden.

In Abbildung 31C ist die erneute Testung von den Speichelproben der gesunden Probanden/-innen Nr. 171 und Nr. 186 dargestellt. Hierfür wurden erneut 5ml Speichel abgenommen und analysiert. Dabei waren alle Proben vor und nach dem Assay negativ. Eine weitere Probe von Proband/-in Nr. 157 konnte nicht gesammelt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei Durchführung des Assays auch in Patientenspeichel Mtb detektiert werden konnte. Es konnten nicht alle Patienten/-innen identifiziert werden, allerdings waren bei 50% der Patientenproben alle drei Replikate nach Durchführung des Verfahrens positiv. Ohne Anreicherung der DNA war dies nur bei einer Probe der Fall.

Gesunde Probanden/-innen können weitestgehend als solche identifiziert werden. Nach der ersten Testung waren 5% der Proben falsch positiv. Davon konnten zwei Drittel nach einer zweiten Durchführung als negativ identifiziert werden.

Ergebnisse 3.3.4: Zusammenfassung

- Mtb konnte im Patientenspeichel nachgewiesen werden.
- 45 Prozent der Patienten konnten sicher als solche identifiziert werden.
- Etwa vier Prozent der Proben waren nach der ersten Testung falsch positiv.

4 Diskussion

Die Tuberkulose-Diagnostik aus Speichel ist bislang durch die geringe Konzentration von Mtb, verglichen mit Sputum, limitiert. Diese Überlegung führte zu der Entwicklung eines Verfahrens, welches das Ziel verfolgt, Mtb im Speichel anzureichern und so den Nachweis der Mtb zu ermöglichen. Das Verfahren wurde zunächst in einem Puffersystem optimiert und erfolgreich getestet. Anschließend wurden mit Mtb versetzte Speichelproben und Speichelproben von Tb-Patienten/-innen analysiert.

4.1 Bindung von Bakterien und DNA durch LB-Beads

Wie auch zuvor in der Dissertationsschrift von Dr. Katharina Kolbe, wurden im hier beschriebenen Verfahren magnetische Beads genutzt, die mit dem Liganden Lipobiotin beschichtet wurden, um Mtb aus Flüssigkeiten zu binden⁹⁶. Der verwendete Ligand stellt den zentralen Bestandteil des Assays dar und wurde schon zuvor von Steinhäuser et. al. verwendet⁹⁷. Lipobiotin wurde damals genutzt, um die hydrophobe Zellwand der Mykobakterien zu markieren. Anschließend wurden die Bakterien unter Verwendung von Streptavidin-markierten magnetischen Partikel magnetisch markiert. So gelang anschließend nach der Infektion von Zellen mit magnetisch markierten Mykobakterien die Isolation und Untersuchung von mykobakterienhaltigen Zellkompartimenten, wie beispielsweise Phagosomen⁹⁷. Aufbauend auf diesen Arbeiten funktionalisierte Dr. Katharina Kolbe magnetische Beads mit Lipobiotin und verglich den Liganden mit einer Reihe chemischer Verbindungen im Hinblick auf die Bindung von Mykobakterien. Von den getesteten Kohlenhydrat- und Lipidliganden erwies sich Lipobiotin als der potenteste Ligand. Mit ihm gelang es Mtb zu binden und die Bakterien so aus Flüssigkeiten zu isolieren⁹⁶. Außerdem ist er einfach und kostengünstig zu synthetisieren. Der Ligand wurde nicht direkt an die magnetischen Beads gekoppelt, sondern über eine Polyethylenglycol-Schicht (PEG) an die Oberfläche der Beads gebunden. Im Jahr 2013 zeigten M. Behra et al., dass magnetische PEG-Beads eine dreifach höhere Bindungsaffinität aufweisen, verglichen mit Partikeln, denen diese Schicht fehlt¹⁰⁸.

In initial durchgeführten Experimenten im Puffersystem zeigte sich, dass Lipobiotin in der Lage ist, vitale Bakterien zu binden und anzureichern. Dies konnte mittels PCR, Fluoreszenzanalyse und CFU-Analyse gezeigt werden. Darüber hinaus lagert sich auch die freie DNA an Lipobiotin an. Vermutlich erklärt sich dies über eine Interaktion zwischen der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Lysinen im Lipobiotinmolekül.

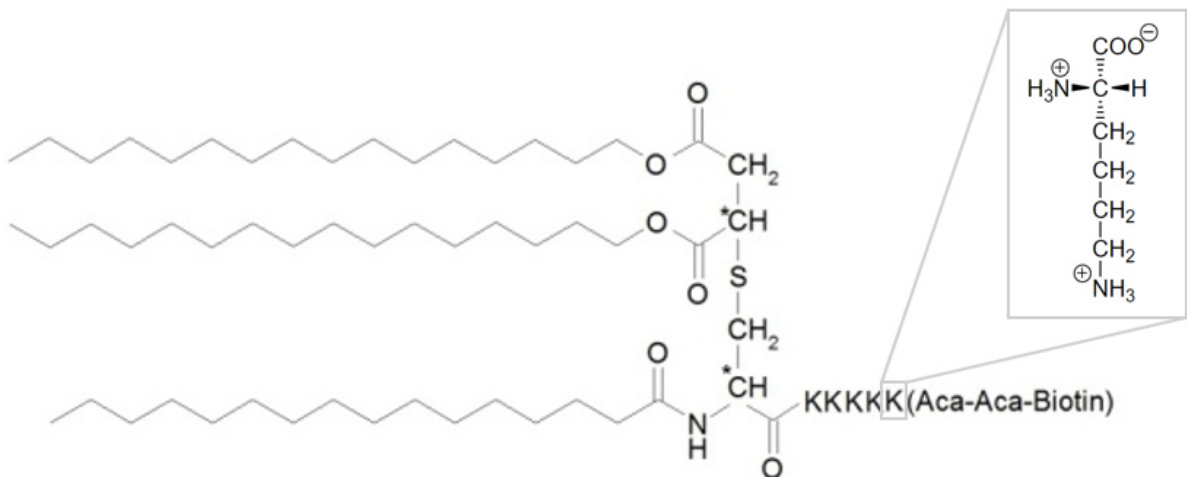


Abbildung 32: Strukturformel von Lipobiotin und Lysin. Die funktionell bedeutsamen Strukturmerkmale des Lipobiotins stellen drei langkettige aliphatischen Seitenketten, sowie fünf Lysine und ein über zwei Spacer - Molekülen (Aca) gekoppeltes Biotin dar. Lysin besitzt zwei Aminogruppen, eine in α -Position zur Carboxylgruppe und eine in der ϵ -Position der Seitenkette¹⁰⁴. Quelle: EMC microcollections GmbH.

Lipobiotin besitzt eine komplexe Struktur, die in Abbildung 32 dargestellt ist. Es weist drei langkettigen aliphatischen Seitenketten auf, davon zwei mit einer Länge von 16 Kohlenstoffatomen sowie eine mit 15 Kohlenstoffatomen. Dieser hydrophobe Teil, durch den Lipobiotin in die mykobakterielle Zellwand integriert wird⁹⁷, ist über fünf Lysine (K) mit einem hydrophilen Teil des Moleküls verbunden. Die Hydrophilie wird durch Lysine und das Biotin gewährleistet, welches über zwei sogenannte „Platzhalter-Moleküle“ (Aca) an die Lysine gekoppelt wurde. Durch diese amphiphilen Eigenschaften liegt das Molekül in Wasser gelöst vor, ist aber aufgrund der drei langkettigen aliphatischen Seitenketten gleichzeitig in der Lage, mit der Zellwand von Mykobakterien zu interagieren.

An die Oberfläche der magnetischen Beads kann Lipobiotin über eines der fünf Lysine gekoppelt werden. Lysin besitzt neben der Aminogruppe in α -Position zur Carboxygruppe eine weitere in ϵ -Position der Seitenkette. Durch eine der Aminofunktionen kann mit der Carboxylgruppe der magnetischen Beads eine Amidbindung eingegangen und die Beads auf diese Weise funktionalisiert werden (vgl. Kapitel 2.4).

Die anderen Lysine liegen aufgrund der ϵ -Aminogruppe im physiologischen pH-Wert protoniert und damit positiv geladen vor. DNA hingegen ist aufgrund des Phosphat-Rückgrades negativ geladen. Diese gegensätzlichen Ladungen im physiologischen pH-Bereich könnten die Interaktion zwischen Mtb-DNA und LB-Beads erklären.

Die Interaktion zwischen freier DNA und Beads führte zunächst zu einer schlechten Detektierbarkeit der Mtb-DNA mittels PCR. Die Beads und die daran haftende DNA müssen vor der Durchführung der PCR entnommen werden. Im verwendeten Assay kann jedoch nicht auf die Lysine im Molekül verzichtet werden, da sie für die Funktionalisierung der Beads erforderlich sind, die über eine Amidbindung an die Carboxylgruppe der

magnetischen Beads erfolgt. Durch Derivatisierung des Liganden wäre es vermutlich möglich, die Anzahl der fünf Lysine zu reduzieren, um so die Interaktion von DNA und Ligand abzuschwächen. Alternativ könnte der Bindungsmechanismus vollständig umgestellt werden. Magnetische Beads mit einer Avidin-Beschichtung, die den Liganden nicht über die Lysine, sondern über den Biotin-Rest binden, würden die Interaktion umgehen. So wäre es in der Theorie möglich, vollständig auf die Lysine zu verzichten. Dieser Aspekt stand allerdings nicht im Fokus dieser Arbeit und könnte in weiterführenden Studien adressiert werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde zunächst getestet, ob die Interaktion der DNA mit den funktionalisierten Beads durch Hinzugabe von verschiedenen Salzen wie Natriumchlorid oder Lithiumchlorid unterbunden werden kann. Dies war nicht der Fall, vielmehr verschlechterte sich die Detektierbarkeit der Mtb-DNA in der PCR. Allerdings wurden nur Salzkonzentrationen bis 40mM getestet. Möglicherweise könnten höhere Konzentrationen die Interaktion verhindern. Dies würden allerdings gleichzeitig die PCR-Analyse beeinflussen, sodass dieser Ansatz nicht weiter untersucht wurde. Stattdessen wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Interaktion der DNA mit den Beads getestet. Dabei konnte eine signifikante Reduktion der Interaktion gezeigt werden. Es wurden pH-Werte zwischen neun und elf getestet. Ein pH-Wert von zehn erwies sich in diesem Versuch als der effektivste. Mit ihm konnte in deutlich mehr Proben DNA nachgewiesen werden, was sich durch eine Reduktion der Ct-Werte in der PCR zeigte. In zukünftigen Versuchen könnten die Auswirkungen eines pH-Wertes von 10,5 untersucht werden. Möglicherweise könnte hierdurch die Interaktion der Lipobiotinbeschichtung mit der DNA noch effektiver verhindert werden. Im basischen Milieu sind die Lysine weniger positiv geladen und die Interaktion wird dadurch verringert.

Lipobiotin ist nicht der einzige Ligand, der Mykobakterien binden kann. Der Firma Microsens Medtech Ltd. gelang es, Mtb mit sogenannten Tb-Beads in einer zweiminütigen Inkubationszeit durch eine hydrophobe Interaktion zu binden¹⁰⁹. Mit diesem Verfahren können die Bakterien angereichert und mittels Kultur, PCR und Mikroskopie analysiert werden^{110–112}. Die Beads sind mit Poly-diallyl-dimethyl-ammonium-chlorid (pDADMAC) beschichtet, ein Ligand, der nicht-kovalent mit den Beads verbunden ist. In weiterführenden Studien wäre es sinnvoll, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren mit dem der Tb-Beads zu vergleichen, um zu beurteilen, welches System die Bakterien am effizientesten bindet und anreichert. Die Tb-Beads wurden bislang nur in Sputum verwendet, eine Testung an Speichel ist bislang nicht erfolgt. Des Weiteren ist es verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen, magnetische Beads mit Kohlenhydrat-Liganden zu beschichten und damit Bakterien in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin oder Speichel zu detektieren^{113–116}. Auch anders funktionalisierte magnetische Beads

können zur Detektion von Mtb genutzt werden. Bei diesem werden sogenannte „Dyna-Beads“ verwendet, die nicht mit der mykobakteriellen Zellwand interagieren, sondern über eine Streptavidin-Beschichtung die bereits extrahierte DNA binden. Dieses Verfahren wird besonders bei einer DNA-Extraktion aus Geweben verwendet, da diese im Gegensatz zur herkömmlichen Phenol/Chlorophorm-Extraktion schneller und einfacher durchzuführen ist^{117,118}. Der gleiche Mechanismus kann auch genutzt werden, um Mtb-DNA in Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Eine gute Anreicherung konnte unter Verwendung von magnetischen Beads aus größeren Mengen Urin erzielt werden¹¹⁹.

Nicht nur die Wahl des richtigen Liganden ist wichtig für die Bindung von Mtb, auch die ausreichende Funktionalisierung ist entscheidend. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung der Beads mit Lipobiotin die Bindung von Mykobakterien verstärkt. Dementsprechend ist es wichtig, die Oberfläche der magnetischen Beads vollständig zu funktionalisieren. Sind alle Bindungsstellen der Beads mit Lipobiotin besetzt, können mehr Bakterien gebunden werden als bei unvollständiger Beschichtung. In den durchgeführten Experimenten wurde die Funktionalisierung der verwendeten Beads nicht überprüft, weshalb es in den kommenden Versuchen sinnvoll wäre, die Funktionalisierungseffizienz objektivierbar zu adressieren. Dies ließe sich unter anderem durch durchflusszytometrische Methoden realisieren. Eine andere Möglichkeit wäre die Zeta-Potential-Analyse. Durch die Funktionalisierung wird die Oberflächenladung der Beads verändert und kann so mit den unfunktionalisierten Beads verglichen werden¹²⁰. Auch durch einen Farbumschlag ließe sich das Ausmaß der Funktionalisierung ebenfalls überprüfen. Unfunktionalisierte und damit nichtreagierte Carboxylgruppen der Beads könnten mittels einer UV-Titration unter der Zuhilfenahme von Toluidin blau O angefärbt werden. So könnte der Funktionalisierungsgrad indirekt ermittelt werden¹²¹. Diese Art der Analysen ist wichtig, um die Daten, die mit unterschiedlichen Chargen Libiotin-markierte Beads erhoben wurden im Detail miteinander zu vergleichen zu können.

4.2 Testung des Verfahrens in Puffer und Speichelproben

Nach Durchführung einer einstündigen Inkubation von Mtb mit den LB-Beads im Puffersystem konnte eine Bindung von Mtb an die Beads gezeigt werden. Sowohl über CFU-Analyse, die Durchflusszytometrie und indirekt über die PCR konnte nachgewiesen werden, dass sich Mtb an magnetische Beads anlagert. Darüber hinaus konnte ein Unterschied hinsichtlich der Bindung zwischen den LB-Beads und den unfunktionalisierten Beads aufgezeigt werden. Aufgrund der Lipobiotin-Beschichtung konnten an den funktionalisierten Beads mehr gebundene Bakterien nachgewiesen werden als an den unfunktionalisierten Beads. Dennoch konnten im Rahmen der CFU-Analyse von mit Mtb inkubierten nicht-funktionalisierten Beads Bakterien nachgewiesen werden. Es liegt also

nicht nur eine spezifische Bindung von Mtb an das Lipobiotin vor, die Bakterien lagern sich auch unspezifisch an die Beads an. Die Adhäsionfähigkeit der Bakterien lässt sich auch an einem anderen Phänomen in den CFU-Analysen zeigen. Auf den Platten kann in jedem Versuch nur etwa die Hälfte der ausgesäten Bakterien detektiert werden. Dies lässt sich durch eine Adhäsion der Bakterien an den Oberflächen des Eppendorfgefäßes, der Pipettenspitzen, der Kanülen und Impfösen erklären. In weiteren Versuchen sollte daher CFU-Experimente mit speziell beschichteten Eppendorfgefäßen und Pipettenspitzen durchgeführt werden, um den bakteriellen Verlust aufgrund von Anhaftungen an den verwendeten Materialien zu minimieren.

Alle verwendeten Methoden zeigten eine signifikant bessere Bindung der Bakterien an die mit Lipobiotin funktionalisierten Beads. Um zu untersuchen, wie effektiv diese Bindung ist und wie hoch der Anteil der Bakterien ist, die aus der Lösung gebunden werden, wurden neben den Beads zusätzlich die Überstände der Proben untersucht. In der PCR Analyse konnte keine mykobakterielle DNA mehr in den Überständen nachgewiesen werden, sodass die Bindung der Mtb Bakterien an die LB-Beads vollständig schien. Allerdings zeigte sich bei der CFU-Analyse der Überstände, dass auch dort noch einige Bakterien kultivierbar waren. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Methoden lässt sich vermutlich durch die unterschiedliche Sensitivität beider Methoden erklären.

Um den Nachweis der Bakterien zu verbessern, wurden verschiedene Parameter des Assays verändert. Zunächst im Anschluss an die bereits beschriebenen Arbeitsschritten eine Ethanolfällung durchgeführt. Diese Fällung hat zwar keinen Einfluss auf die Bindung der Bakterien an die Beads, sie ist allerdings in der Lage, die DNA aufzureinigen und zu konzentrieren, so dass die DNA in der PCR schneller und zuverlässiger detektiert werden kann. Anschließend wurden verschiedene Inkubationszeiten getestet. Dabei ergab sich für keine der Bedingungen ein signifikanter Vorteil, sodass eine einstündige Inkubation beibehalten wurde. Dennoch lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die Bindung der Bakterien an die LB-Beads wahrscheinlich sehr schnell erfolgt, da die 15-minütige Inkubation ein vergleichbares Ergebnis im Vergleich zur einstündigen Inkubation zeigt. Wohlmöglich findet die Anlagerung der Bakterien schon in den ersten Minuten statt, sodass in den weiterführenden Experimenten geringere Inkubationszeiten ausgetestet werden sollten. Auch bei den bereits beschriebenen „TB-Beads“ ist eine Inkubationszeit von zwei Minuten ausreichend¹²². Unter Verwendung einer kürzeren Inkubationszeit könnte der Assay verkürzt werden und ein Ergebnis schneller vorliegen. Um möglichst viele Bakterien aus dem Puffersystem zu binden und zu isolieren, wurden mehrere Inkubationsschritte durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit jeder Inkubation Bakterien aus der Lösung gebunden werden, sodass eine wiederholte Inkubation in weitergehende Versuchen sinnvoll erscheint. Eine Steigerung der Anzahl funktionalisierter Beads in einem

Inkubationsschritt zu verwenden erscheint allerdings nicht zielführend. Eine einstündige Inkubation von 75µl der LB-Beads zeigt keinen signifikanten Vorteil gegenüber der Inkubation mit nur einem Drittel der Beads. Daraus lässt sich ein bestehendes Gleichgewicht der Anlagerung der Bakterien an den Beads ableiten. Zusammenfassend war es mit dem entwickelten Verfahren möglich, die Bakterien aus dem Puffersystem zu binden, die DNA zu extrahieren, anzureichern und in der PCR nachzuweisen.

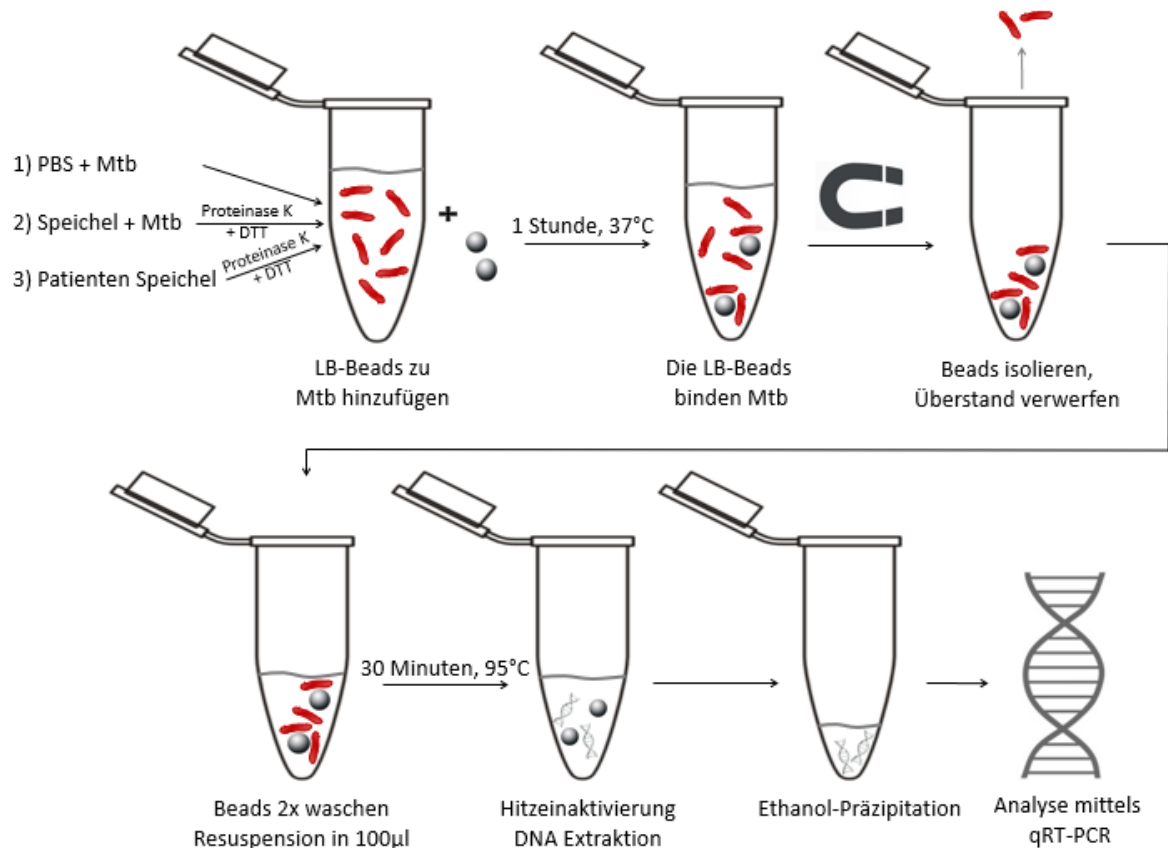


Abbildung 33: Einzelne Schritte des entwickelten Adhäsionsassays. Zu den verschiedenen Proben werden LB-Beads hinzugefügt und inkubiert. Die Beads wurden mittels Magnetständer isoliert, der Überstand abgenommen und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Beads gewaschen und in PBS resuspendiert. Nach einer Hitzeinaktivierung erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR.

Das ursprüngliche Ziel, Mtb und deren DNA in Speichelproben nachzuweisen, wurde daraufhin untersucht. Zunächst wurde die Viskositäts-Reduktion mit Proteinase K und Dithiothreitol (DTT) untersucht. Nach der Behandlung sind die Speichelproben gut pipettierbar, ein Effekt auf die Vitalität von Mtb konnte nicht nachgewiesen werden. Wie auch im Puffersystem, konnte eine signifikante Anreicherung mittels der PCR und CFU-Analyse erreicht werden. In der CFU Analyse zeigte sich, dass eine Anreicherung bei einer Bakterienmenge von 10^5 Bakterien möglich war, dieser Effekt bei 10^6 Bakterien nicht mehr zu detektieren war. Möglicherweise ist bei 10^6 Bakterien die Bindungskapazität erreicht, so dass nicht mehr Bakterien an die Beads binden können und daher keine Anreicherung möglich ist. Daher sollte in nachfolgenden Studien der Versuch mit verschiedenen

Bakterienmengen wiederholt werden, um diesen Sättigungseffekt genauer zu untersuchen. In der PCR Analyse konnte neben der Anreicherung der Mtb-DNA eine bessere Detektionsrate der Mtb-DNA erzielt werden. Durch Verwendung des Assays wurden die Anzahl negativer Messergebnisse reduziert und sowie die mittleren Ct-Werte reduziert. Dies spricht nach Durchführung des Assays für eine höhere DNA Konzentration in den Proben als in den unbehandelten Speichelproben.

Ein ähnliches und vielversprechendes Ergebnis konnte in der zweiten verblindeten Testung von Patientenproben gezeigt werden. Von den zehn Tuberkulosepatienten/-innen konnten fünf nach der Durchführung des Assays sicher als Erkrankte identifiziert werden. Ohne den Assay war es nur eine Probe, die in allen Replikaten Mtb-DNA detektierte. Ein deutlicher Vorteil des Verfahrens und eine Verbesserung der Sensitivität konnte also erzielt werden. Gleichzeitig wurde bei den gesunden Probanden/-innen in 95% der Replikate keine DNA-detektiert im ersten Durchgang des Versuchs war der Vorteil des Verfahrens weniger deutlich. Zwar wurden immer noch die gesunden Probanden/-innen und vier von zehn Patienten/-innen sicher identifiziert, allerdings zeigten auch vier Proben schon vor dem Assay ein positives Ergebnis, wobei der Assay eine Person als Erkrankte/-r identifizierte, die vorher nicht eindeutig positiv war. Hier wird der Aspekt der Funktionalisierung der Beads wieder wichtig. Leider sind die Experimente nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Chargen verwendet wurden, die nicht hinsichtlich ihrer Funktionalisierungseffizienz untersucht wurden. Möglicherweise waren die Beads der ersten Testung schlechter funktionalisiert, sodass der Assay nur einen geringen Effekt zeigt. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei den nächsten Versuchen adressiert werden muss, ist die Bakterienanzahl in den Ausgangsproben. Um noch aussagekräftigere Ergebnisse zu bekommen, sollten bei den kommenden Patientenproben nicht nur die letzte Ziehl-Neelsen-Färbung aus dem Sputum dokumentiert werden. Vielmehr sollte eine kulturelle Anzucht, eine Einbeziehung der Kulturdauer bis zur Positivität und eine Färbung nach Standards des Nationalen Referenzzentrums für Mykobakterien erfolgen. So ließe sich die Bakterienzahl der Speichelproben bestimmen und mit den PCR-Ergebnissen korrelieren. Momentan ist leider nur ein indirekter Bezug zwischen der Sputum-Anfärbung und den Ergebnissen möglich.

Die gesammelten Speichelproben von Gesunden, sowie an Tuberkulose erkrankten Menschen, wurden nicht standardisiert gesammelt. Um die Proben besser vergleichen zu können, sollten sie morgens vor dem Essen und vor dem Zähneputzen gesammelt werden. So wären möglichst viele Bakterien im Speichel. Auch das Geschlecht, das Alter der Probanden/-innen und Patienten/-innen, sowie mögliche Infekte und Erkrankungen könnten erhoben und anschließend bei der Analyse der PCR-Ergebnisse berücksichtigt werden.

Um den Assay unter möglichst praxisnahen Bedingungen zu testen, wäre einer der nächsten Schritte, Speichelproben wie in Kapitel 3.3.2 nicht nur mit dem Mtb Laborstamm zu versetzen, sondern klinische Isolate zu nutzen. Unterschiedliche Bindungsaffinitäten und Nachweissensitivitäten zwischen den einzelnen Stämmen könnten so untersucht werden. Eventuell würde dies auch einen Hinweis darauf geben, warum die Patientenproben, trotz ähnlicher Bakterienlast in der Ziehl-Neelsen-Färbung, so unterschiedliche Ergebnisse in der PCR zeigten.

4.3 Ausblick

Derzeitig wird eine aktive pulmonale Tuberkulose mittels Sputumproben diagnostiziert¹²³. Allerdings ist es besonders alten und geschwächten Patienten/-innen körperlich nicht möglich Sputum abzuhusten, und auch Kinder oder behinderte Patienten/-innen haben Schwierigkeiten, Sputumproben abzugeben¹²⁴. Besonders bei Kindern ist nicht nur der mykobakterielle Nachweis wegen der notwendigen Magensaftanalyse erschwert, auch die bildgebenden Verfahren und immunologischen Nachweise sind bei Kindern weniger sensitiv¹²⁵. Die anderen diagnostischen Verfahren, wie die Bildgebung oder der IGRA, sind nicht direkt auf Kinder übertragbar, so dass Analysen der Magensäure zum Einsatz kommen⁶³. Gleichzeitig wäre aber eine sensitive Diagnostik für Kinder ein prognostisch wichtiger Faktor für die gesamte Gesellschaft. Ein diagnostischer Test aus Speichelproben wäre daher nicht nur schneller und einfacher für alle Patienten/-innen, für Kinder wäre dies eine nicht-invasive Alternative.

Das langfristige Ziel der durchgeführten Experimente stellt nicht nur die Entwicklung eines Tests für Speichelproben dar, in den nächsten Schritten sollen nun nicht mehr magnetische Beads mit Lipobiotin beschichtet werden, die Bindung des Liganden an eine verformbare Matrix könnte dann zu einem diagnostischen Kaugummi führen. Dabei kauen Patienten/-innen den mit Lipobiotin beschichteten Kaugummi, dieser bindet im Speichel vorhandene Bakterien, unter anderem Mtb. Bei einer Mtb spezifischen PCR Analyse im Labor könnten die Tuberkuloseerreger nachgewiesen werden. Ein besonders interessantes Anwendungsgebiet wäre nicht unbedingt der Einsatz in Deutschland, sondern die Nutzung in Endemiegebieten, wie Afrika oder Osteuropa. Besonders dort, wo der Anschluss der Patienten/-innen an die Kliniken nicht gewährleistet werden kann. Da der Assay vor diesem Hintergrund entwickelt wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichsweise einfache Methoden verwendet. Statt einer aufwändigen chemischen DNA-Extraktion wurde stattdessen auf eine einfache Hitzeinaktivierung zurückgegriffen. So kann der Assay auch in weniger gut ausgestatteten Laboren und kostengünstig durchgeführt werden.

Medizinische Kaugummis gibt es schon lange¹²⁶, ein Beispiel ist der Aspirin-Kaugummi¹²⁷. Auch diagnostische Kaugummis, die verschiedene Biomarker von in der Mundhöhle anwesenden Pathogenen binden und sich daraufhin verfärben, sind für das Selbst-Monitoring einsetzbar¹²⁸. Auch ein diagnostischer Kaugummi für Malariainfektionen ist momentan in der Entwicklung¹²⁹. Für die Diagnostik von Mtb-Infektionen wurde bislang kein Kaugummi entwickelt. Denkbar für einen solchen Kaugummi wäre eine Matrix aus Nanozellulose oder Naturschwämmen bestehend aus Kollagen. Alternativen zum Kaugummi könnte eine Mundspüllösung sein. Da sowohl Kaugummis als auch solche Lösungen leicht verschluckt werden können, sind sie allerdings für Kinder nur eingeschränkt geeignet. Mit Lipobiotin beschichtete Lutscher oder Schnuller wären für die

jeweiligen Altersstufen eine Alternative. Auch hier sind medizinisch eingesetzte Produkte bekannt, wie der Fentanyltscher¹³⁰, oder mit Zucker beschichtete Schnuller zur Schmerzreduzierung bei Kindern^{131,132}.

Nicht nur zur Diagnostik im Hinblick darauf, ob der/die Patient/-in an einer aktiven Tuberkulose leidet oder nicht, könnte der entwickelte Ansatz verwendet werden. Denkbar wäre ebenfalls eine Kombination des Assays mit dem GeneXpert-Verfahrens. So könnte nicht nur eine Infektion, sondern auch eine bestehende Rifampicin-Resistenz diagnostiziert werden⁵³. Unter der Verwendung anderer Primer und Sonden könnten auch andere Resistenzen untersucht werden. Die isolierte Mtb-DNA könnte darüber hinaus dem Next Generation Sequencing (NGS) zugeführt werden. Je nachdem in welchem Verhältnis die Tuberkulose-Bakterien gegenüber der normalen Mundflora an die Beads binden und damit die DNA in den Proben vorliegt, könnte direkt eine NGS Analyse angeschlossen werden. Bislang mussten die Proben für eine solche Analyse zunächst kultiviert werden, da Mtb-DNA spezifisch angereichert werden musste. Im Jahr 2015 gelang es Bwanga et. al erstmals die NGS-Analyse innerhalb eines Tages durch Diagnostik von Tb durchzuführen¹³³. Im gleichen Jahr und in 2017 gelang dies auch zwei weiteren Forschungsgruppen^{134,135}. Diese nutzten in beiden Verfahren Beads, um freie Mtb-DNA zu binden, zu isolieren und anzureichern. Da auch die LB-Beads die Eigenschaft besitzen Mtb-DNA zu binden, wäre auch die Nutzung fürs NGS eine mögliche Anwendungsmöglichkeit. Somit könnten verschiedene Resistenzen schnell und zuverlässig untersucht werden, sodass zeitnah ein auf den Patienten/-innen abgestimmtes Therapieregime erstellt werden kann. Im Hinblick auf die steigenden Fallzahlen von Tb, besonders den XDR-Tb-Fällen, wäre dies ein wichtiger Fortschritt⁵. Damit könnte der/die Patient/-in schon zu Beginn gezielt behandelt und die Ansteckungsgefahr für andere Personen deutlich reduziert werden.

Lipobiotin ist zwar in der Lage, Mtb Bakterien zu binden. Spezifisch für diese Bakterien ist der Ligand jedoch nicht. Schon Steinhäuser et al. fanden, dass Lipobiotin auch mit der Zellwand anderer Mykobakterien (bspw. *M. avium*), gram negativer Bakterien (bspw. *E. coli*) und gram positiven Bakterien (bspw. *Listeria monocytogenes*) interagiert⁹⁷. Damit binden die LB-Beads nicht nur Mtb im Speichel, sondern auch viele andere Bakterienarten und eventuell sogar Pilze. Bei der Verwendung der PCR-Analyse stellt dies allerdings kein Problem dar, da sie spezifisch auf die Mtb-DNA reagiert. Bei den durchgeführten CFU-Analysen konnten auch andere Bakterienkolonien auf den Platten detektiert werden (vgl. Kapitel 3.3.3.2).

Vor diesem Hintergrund ist die Diagnostik von atypischen Mykobakterien ebenfalls naheliegend, da Lipobiotin mit großer Wahrscheinlichkeit auch an nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) bindet. Für *M. avium* wurde dies bereits gezeigt⁹⁷. Diagnostisch ergeben sich bei manchen NTM ähnliche Schwierigkeiten aufgrund der langen

Generationszeit. Klinisch können sich solche Infektionen nicht nur in der Lunge widerspiegeln, sondern in allen Organsystemen manifestieren. Dies passiert besonders bei Immunsupprimierten, z.B bei HIV-Infektion. Noch häufiger als bei Mtb treten bei NTM Antibiotikaresistenzen auf, die ebenfalls mit Hilfe der PCR untersucht werden könnten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht nur eine Detektion der Bakterien im Speichel möglich ist. Durch die Inkubation der Proben mit DTT und Proteinase K ist auch ein Nachweis aus weitaus viskoserem oder sogar soliden Materialien denkbar^{105,106}.

Da Lipobiotin nicht spezifisch Mykobakterien bindet, sondern auch mit der Zellwand anderer Bakterien interagiert, wäre es ebenfalls möglich ein diagnostisches Verfahren für eben solche Erreger zu entwickeln. Für *Listeria monocytogenes* wurde 2014 ein ähnlicher Ansatz von Schmelcher et. al verfolgt. Es wurden zunächst Proteine identifiziert, die die Bakterien über die Zellwand binden und anschließend magnetisch separieren. So konnte gegenüber dem üblichen diagnostischen Test, wie beispielsweise der Kultivierung, ein schnelleres Ergebnis erzielt werden und die Sensitivität verbesserte sich ebenfalls¹³⁶. Analoge Vorgehensweisen für andere Bakterien sind ebenfalls möglich. Weitere Studien bezüglich der Spezifität des Lipobiotins sollten angestrebt werden und könnten einen Aufschluss darüber geben, welche Bakterien und Bakteriengruppen durch Lipobiotin gebunden werden und für ein solches Verfahren infrage kommen.

4.4 Zusammenfassende Bemerkung

Mit der Idee, Mtb in Speichelproben nachzuweisen, wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, die Bakterien in Lösung zu binden, deren DNA anzureichern und diese anschließend in der PCR nachzuweisen. Hierzu wurden magnetische PEG-Beads mit Lipobiotin, einem Liganden, der mit der mykobakteriellen Zellwand interagiert, beschichtet. Unter Optimierung des pH-Wertes und Einführung einer Ethanolfällung gelang es Mtb im Puffersystem, in mit Mtb versetzten Speichelproben, sowie in Speichelproben von Tuberkulosepatienten/-innen nachzuweisen. Durch den Assay konnte die Sensitivität von Speicheldiagnostik signifikant verbessert werden. Weitere Studien werden das Ziel verfolgen einen diagnostischen Kaugummi für den Nachweis einer infektiösen Tuberkulose, besonders bei Kindern, zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Tuberkulose ist die häufigste infektiöse Todesursache weltweit. Die aktive pulmonale Tuberkulose wird mit der mikrobiellen Analyse von Sputumproben diagnostiziert. Allerdings ist es für manche Patienten/-innen, besonders Kinder und Geschwächte, schwierig, Sputumproben zu generieren. Einige Studien zeigten, dass es möglich ist, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) im Speichel nachzuweisen, die Entwicklung von diagnostischen Tests für Speichelproben ist allerdings aufgrund der geringeren Bakterienzahlen und schlechten Sensitivität nicht weiterverfolgt worden. Darauf aufbauend entstand die Hypothese, dass die Anreicherung der Bakterien und deren DNA die Sensitivität der Speichelproben verbessern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, um Mtb aus Flüssigkeiten mittels PEG-COOH-Beads, die mit Lipobiotin (LB) beschichtet sind, anzureichern und nachzuweisen. LB ist ein synthetisch hergestelltes Lipid mit drei langkettigen aliphatischen Seitenketten, das bekanntermaßen mit der mykobakteriellen Zellwand interagiert. In ersten Experimenten wurden verschiedene Mengen von Mtb in Phosphatpuffer mit LB-Beads für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Beads magnetisch isoliert, gewaschen und mittels Fluoreszenzzytometrie auf gebundene Mtb untersucht. Dabei konnte eine vermehrte Bindung von Mtb an LB-Beads, verglichen mit unfunktionalisierten Beads, nachgewiesen werden. Nach einer Hitzeinaktivierung, gefolgt von magnetischer Isolation und Präzipitation der Mtb-DNA, konnte durch qRT-PCR mit Mtb spezifischen Primern konzentrationsabhängig Mtb-DNA nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es durch Einsatz des Verfahrens möglich, die DNA signifikant anzureichern. Anschließend wurde getestet, ob mit dem Verfahren Mtb und Mtb-DNA in Mtb-versetzten Speichelproben angereichert werden kann, deren Viskosität zuvor reduziert wurde. Auch hier zeigte sich nach Einsatz des Verfahrens basierend auf der Reduktion der Ct-Werte eine signifikante Anreicherung mykobakterieller DNA. Das Detektionslimit lag zwischen 10^3 - 10^2 Bakterien/5ml. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Verfahren zweifach mit einer verblindeten Testung von zehn Tuberkulosepatienten/-innen und zehn gesunden Probanden/-innen getestet. Im ersten Versuch konnten bei fünf der zehn Patienten/-innen Mtb-DNA sicher nachgewiesen werden, wobei 95% der Messungen der gesunden Probanden/-innen negative waren. Im zweiten Versuch wurden vier der zehn Patienten/-innen identifiziert und 97% der Kontroll-Proben verblieben negativ.

Die vorliegenden Daten bilden damit eine sehr gute Grundlage um langfristig die Entwicklung eines diagnostischen Tests, der Mtb in Speichelproben von Tuberkulosepatienten (z.B. unter Verwendung eines funktionalisierten Kaugummis oder einer Mundspüllösung) nachweist, zu ermöglichen.

6 Abstract

Tuberculosis is the leading cause of death from a single infectious agent worldwide. Active pulmonary tuberculosis is diagnosed by microbial analysis of sputum samples. However, it is difficult for some patients, especially children and infirm people, to generate sputum samples. Some studies have shown that it is possible to detect *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) in saliva, but the development of diagnostic tests for saliva samples has not been pursued due to the lower bacterial counts and poor sensitivity. Based on this, the hypothesis was developed that the enrichment of bacteria and their DNA can improve the sensitivity of saliva samples.

In the present work a novel method was developed to enrich and detect Mtb from fluids using PEG-COOH beads coated with lipobiotin (LB). LB is a synthetic lipid with three long chain aliphatic side chains, which is known to interact with the mycobacterial cell wall. In initial experiments, different amounts of Mtb were incubated in phosphate buffer with LB beads for one hour. Subsequently, the beads were magnetically isolated, washed and examined for bound Mtb by fluorescence cytometry. An increased binding of Mtb to LB-beads compared to non-functionalized beads could be detected. After heat inactivation, followed by magnetic isolation and precipitation of Mtb DNA, it was detected by qRT-PCR with Mtb specific primers. In addition, it was possible to significantly enrich the DNA by using this method. Subsequently, it was tested whether Mtb and Mtb-DNA could be enriched in Mtb-transferred saliva samples whose viscosity had been reduced before. Here, too, a significant enrichment of mycobacterial DNA was found after the application of the method based on the reduction of the Ct values. The detection limit was between 10^3 - 10^2 bacteria/5ml. Based on these results, the procedure was tested twice with a blinded test of ten tuberculosis patients and ten healthy volunteers. In the first trial, Mtb-DNA was reliably detected in five of the ten patients, with 95% of the measurements of the healthy volunteers being negative. In the second trial four of the ten patients were identified and 97% of the control samples remained negative.

The available data thus form a very good basis for the long-term development of a diagnostic test that detects Mtb in saliva samples of tuberculosis patients (e.g. using a functionalized chewing gum or mouth rinse).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹⁸ F-FDG PET	2-(¹⁸ F) fluoro-2-deoxy-D-glucose- PET
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Broncheoalveoläre Lavage
BBQ	Black Berry Quencher
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
Bidest.	Bidestilliert
CFU	Kolonie-formende Einheit
COOH	Carboxygruppe
CT (Bildgebung)	Computertomographie
Ct (PCR)	Cycle threshold
dd.H ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribunokeinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
<i>g</i>	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H37Rv	Laborstamm von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IGRA	Interferon-Gamma Release Assay
LB	Lipobiotin
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
n.d.	Nicht detektierbar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NAT	Nukleinsäureamplifikationsverfahren
NGS	Next Generation Sequencing
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTM	nichttuberkulöse Mykobakterien
OADC	oleic acid, albumin, dextrose, catalase
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDADMAC	Poly-diallyldimethyl-ammonium-chlorid
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronemissionstomographie
Prot. K	Proteinase K
qRT-PCR	Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rpm	„Revolutions per minute“; Umdrehungen pro Minute
rpoB	RNA-Polymerase beta
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
Tb	Tuberkulose
TE	Tris-EDTA
THT	Tuberkulin-Hauttest
unfunkt. Beads	Unfunktionalisierte Beads
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZN	Ziehl-Neelsen
PBS	Phosphate buffered saline
dH ₂ O	Destilliertes Wasser

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genutzte Reagenzien	22
Tabelle 2: Genutzte Puffer und Medien	24
Tabelle 3: Mykobakterienstämme	25
Tabelle 4: PCR Primer	28
Tabelle 5: FRET-Sonden	28
Tabelle 6: qRT-PCR Protokoll (50 Zyklen)	28
Tabelle 7: Mikroskopische Graduierung der Ziehl-Neelsen-Färbung	32
Tabelle 8: Ergebnisse aus Abbildung 23	57
Tabelle 9: Ergebnisse aus Abbildung 26	62

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozent der neuinfizierten und reaktivierten Tuberkulosefälle von Kindern (Alter <15 Jahre) in 2017.	9
Abbildung 2: Röntgenaufnahme des Thorax im p.a.-Strahlengang.	11
Abbildung 3: CT-Aufnahme im Transversal-schnitt.	11
Abbildung 4: Ziehl-Neelsen-Färbung einer Probe eines Tuberkulose-Patienten/-in.	12
Abbildung 5: Auramin-Rhodamin-Färbung.	13
Abbildung 6: Kulturen von <i>M. tuberculosis</i> auf Agar.	14
Abbildung 7: Prozentzahl der neu diagnostizierten Tb-Erkrankungen mit MDR/RR-Tb in 2017.	16
Abbildung 8: Bindung von Mtb H37Rv an funktionalisierte magnetische Beads ⁹⁶	20
Abbildung 9: Einzelne Schritte des entwickelten Adhäsionsassays – magnetische Separation und Analyse von Mtb aus PBS.	26
Abbildung 10: CFU (Beads) nach Inkubation von Mtb mit Lipobiotin- bzw. unfunktionalisierten Beads.	34
Abbildung 11: CFU (Überstände) nach Inkubation von Mtb mit Lipobiotin- bzw. unfunktionalisierten Beads.	34
Abbildung 12: Fluoreszenzanalyse nach Assay mit LB- und unfunktionalisierten Beads.	36
Abbildung 13: Analyse der Überstände nach Inkubation von Mtb mit LB- und unfunktionalisierten Beads in PBS.	38
Abbildung 14: Interaktion von thermisch extrahierter Mtb-DNA mit LB- und unfunktionalisierten Beads.	40
Abbildung 15: Interaktion von aufgereinigter Mtb-DNA mit LB- und unfunktionalisierten Beads.	42
Abbildung 16: Detektierbarkeit der Mtb-DNA bei An- und Abwesenheit von LB-Beads in der PCR.	43
Abbildung 17: Einfluss von NaCl und LiCl auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA.	44
Abbildung 18: Einfluss des pH-Wertes auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA.	46
Abbildung 19: Interaktion von thermisch extrahierter Mtb-DNA mit LB-Beads bei einem pH-Wert von 7,4 (A) und 10 (B).	48
Abbildung 20: Einfluss der DNA-Ethanol-Fällung auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA.	49
Abbildung 21: Einfluss der Inkubationszeit auf die Detektierbarkeit der Mtb-DNA.	51
Abbildung 22: Mehrmalige Inkubation von Mtb mit LB-Beads.	53
Abbildung 23: Einfluss der Inkubation mit Proteinase K und DTT auf die Rheologie der Speichelproben.	56
Abbildung 24: Einfluss der Inkubation mit Proteinase K und DTT auf das Wachstum von Mtb.	58

Abbildung 25: Einfluss der Inkubation von Proteinase K und DTT auf das Wachstum oraler Begleitflora.....	59
Abbildung 26: Assay mit Speichelproben von gesunden Probanden/-innen, die mit Mtb versetzt worden sind.....	61
Abbildung 27: Einfluss von Penicillin G und Amphotericin B auf das Wachstum von Mtb (A) und oraler Begleitflora in Speichelproben (B).....	63
Abbildung 28: CFU Analyse nach Durchführung des Assays in mit Mtb versetzten Speichelproben.....	65
Abbildung 29: Nährboden mit mehreren rötlichen Kolonien des mCherry-Mtb-Stammes und eine weißliche Kolonie (rote Umrandung).	66
Abbildung 30: Erster Satz des Assays mit verblindeten Speichelproben. Proben von Tb-Patienten/-innen (A) und gesunden Probanden/-innen (B).....	68
Abbildung 31: Zweiter Satz des Assays mit verblindeten Speichelproben. Proben von TB-Patienten/-innen (A), gesunden Probanden/-innen (B) und eine Wiederholung von zwei Speichelproben der gesunden Probanden/-innen (C).	70
Abbildung 32: Strukturformel von Lipobiotin und Lysin.....	73
Abbildung 33: Einzelne Schritte des entwickelten Adhäsionsassays.....	77

7.4 Lebenslauf



Julia Hansen

Am Thieleshof 84

40699 Erkrath

JuliaHansen93@gmx.de

Geboren: 03.02.1993, Hilden

Studium**Humanmedizin**

10/2012-11/2019 an der Universität zu Lübeck (1,5)
 07/2015-12/2015 an der Universität in Bergen, Norwegen
 10/2016-2018 Promotion, Mikrobielle Grenzflächenbiologie,
 Forschungszentrum Borstel, Sülfeld

Schulbildung

08/2009-07/2011 Junior Management School, Düsseldorf (2,0)
 07/2012 Abitur am Gymnasium am Neandertal (1,1)

Sonstige Erfahrungen**Famulaturen**

02/2015-03/2015 Allgemein- und Visceralchirurgie, St. Joseph Klinik,
 Hilden
 07/2016-08/2016 Allgemeinmedizin, Praxis Dres. Wallstein, Erkrath
 08/2016-09/2016 Augenheilkunde, Augen Praxisklinik, Lübeck
 03/2017-04/2017 Gynäkologie, Victoria Hospital,
 Mahé, Seychellen
 08/2017-09/2017 Experimentelle Infektiologie, Forschungszentrum
 Borstel, Sülfeld
 02/2018-03/2018 Anästhesiologie, Sana Klinik, Lübeck

sonstige Tätigkeiten

01/2015-05/2015 Forschungsmitarbeiter im Institut für
 Anästhesiologie
 03/2018-07/2018 Tutor des Physiologie Praktikums,
 Universität zu Lübeck

Summer School

09/2016 Tschetschenische staatliche Universität Grozny

Vorträge & Posterpräsentationen & Kongresse	11/2016	6. Lübecker Notfalltag
	08/2017	Posterpräsentation, Mycobact 2017, Stockholm, Schweden
	09/2017	Posterpräsentation, DZIF Jahrestagung 2017, Hamburg
	11/2017	Posterpräsentation, DZIF Autumn School 2017, Lübeck
	02/2018	Vortrag, Infektiologischer Kongress, Oberjoch
Sprachkenntnisse	Deutsch	Muttersprache
	Englisch	sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
	Norwegisch	gute Kenntnisse in Wort und Schrift
	Latinum	

7.5 Ethikantrag



FZB • Parkallee 1-40 • D-23845 Borstel

Ethikkommission der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
Haus 2
23562 Lübeck

Dr. Christian Herzmann
Leiter Klinisches Studienzentrum

Parkallee 35
D-23845 Borstel

Tel: +49.4537.188 8080
Fax: +49.4537.188 6360

cherzmann@fz-borstel.de
studienzentrum@fz-borstel.de
www.fz-borstel.de

Ethikantrag für anonymisierte Speichelproben; Az 14-079A
(TuberChewLosis)

Borstel, den 21.02.2017

Sehr geehrte Damen und Herren,

wie per e-mail (25.1.2017 und 14.2.2017) mit Frau Dr. Hüppe abgesprochen, möchte Sie über ein Studienvorhaben informieren, das an anonymisierten Speichelproben im Forschungszentrum Borstel durchgeführt wird.

Probenmaterial:	5ml Speichel je Proband
Probanden:	40 Patienten mit offener Tuberkulose 40 gesunde Probanden
Risiko bei der Probenentnahme:	nicht vorhanden
Datenerfassung / -speicherung:	es werden keine persönlichen / medizinischen Daten erfasst (anonymisierte Proben)

Hintergrund:

Tuberkulose (Tb), hervorgerufen durch das *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ist weltweit die am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit. Da sie oft die Lunge betrifft, werden Sputumproben zur Diagnosesicherung und Therapiekontrolle verwendet. Für einige Patientenkollektive (z.B. bei Kindern) ist es jedoch nicht immer möglich, Sputum zu generieren, weshalb Speichel ein alternatives Probenmaterial darstellen könnte. Durch seine vergleichsweise einfache Gewinnung bietet Speichel einen entscheidenden Vorteil. In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass es möglich ist Mtb im Speichel von Patienten mit offener Tuberkulose nachzuweisen [Eguchi et al, 2003; Lee et al, 2004, Palakuru et al, 2012; González Mediero et al, 2015]. Allerdings zeigte sich eine geringere Sensitivität gegenüber

der Sputumdiagnostik. Daher beschäftigen wir (PD Dr. Norbert Reiling, FZ Borstel, und ich) uns mit einem Verfahren beschäftigen, mit dem es möglich ist Mtb aus einer Flüssigkeit anzureichern.

Im Rahmen einer medizinischen Promotion, die vom Deutschen Zentrum für Infektionsmedizin (DZIF) unterstützt wird, untersucht unsere Doktorandin, Julia Hansen, wie solch eine Anreicherung erreicht werden kann.

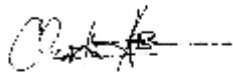
Bei einer Anwendung dieses Verfahrens auf Speichelproben soll eine Zunahme der Sensitivität des Mtb-Nachweises erreicht werden. Hierfür wurde zuerst ein Ligand identifiziert, der mit der Zellwand der Mykobakterien interagiert und diese bindet. Anschließend wurden pegylierte Beads mit diesem Liganden funktionalisiert und ein Assay entwickelt, der durch verschiedene Schritte in der Lage ist, die Bakterien für einen Nachweis mittels PCR anzureichern. Die freie DNA wird mithilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR analysiert.

Das System soll nun auf Speichelproben übertragen und weiter verbessert werden. Die beantragte anonymisierte Biomaterialiensammlung dient einer methodischen Weiterentwicklung, bevor im Rahmen einer klinischen Prüfung Spezifität und Sensitivität geprüft werden können (folgt in gesondertem Antrag).

Hierzu werden auch Speichelproben einer gesunden Kontrollgruppe benötigt. Der Speichel wird mit Mtb versetzt und anschließend der entwickelte Assay durchgeführt. Sind die Bakterien auch in diesem System nachweisbar, sollen aus Speichelproben von Patienten mit einer offenen Tuberkulose Mykobakterien nachgewiesen werden.

Das langfristige Ziel dieser Arbeit soll sein, ein Kaugummi mit dem Liganden zu entwickeln, welcher Mtb aus dem Speichel anreichert und einen Nachweis mittels PCR ermöglicht.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Christian Herzmann

7.6 Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Christian Herzmann
Leiter Klinisches Studienzentrum
Forschungszentrum Borstel
Parkallee 35
23845 Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzenden:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzenden:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Eromann
Tele: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 14-079A
Datum: 28. Februar 2017

TuberChewLosis

Hier: Speichelproben – Ihr Schreiben vom 21. Februar 2017

Sehr geehrter Herr Dr. Herzmann,

hiermit nehme ich die Änderungen zur Kenntnis.

Folgende Unterlagen haben vorgelegen:

- Ihr Anschreiben vom 21. Februar 2017
- Antrag vom 21. Februar 2017
- Patienten- und Probandeninformation und Einwilligung in der Version vom 21. Februar 2017.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

CA
157A

Patientenaufklärung

**Ihr Prüfzentrum**

Forschungszentrum Borstel, Klinisches Studienzentrum, Parkallee 35, 23845 Borstel
Tel. 04537-188-8080
Dr. Christian Herzmann

Speichelsammlung für das Projekt TuberChewLosis

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, eine Speichelprobe (5ml) für ein wissenschaftliches Projekt zu spenden. Ihre Teilnahme an diesem Forschungsprojekt ist freiwillig.

Was soll untersucht werden?

Sie leiden an Tuberkulose, einer bakteriellen Infektionskrankheit, die die Lunge befällt und schädigt. In Ihrem Fall haben die Bakterien Anschluss zu den Atemwegen erhalten, sodass es sich um eine „offene Tuberkulose“ handelt. Dadurch können sich die Erreger im ausgehusteten Auswurf (Sputum) und im Speichel befinden. Momentan wird ihr Auswurf, den Sie hochhusten, zur Diagnostik und Behandlungskontrolle herangezogen. Mithilfe der Probe, um die wir Sie bitten, versuchen wir eine Methode zu entwickeln, mit der die Bakterien auch im Speichel nachgewiesen werden können.

Welche Untersuchungen sind geplant und was geschieht mit den Speichelproben?

Wir bitten Sie, ca. 5 ml Speichel in ein steriles Röhrchen zu füllen, das Sie von uns erhalten. Bitte nicht abhusten, sondern nur Speichel aus der Mundhöhle „zusammensaugen“. Anschließend wird der Speichel auf das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* untersucht.

Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Die Abgabe der Speichelprobe ist ohne Risiko. Es werden keine persönlichen oder gesundheitsbezogenen Daten erhoben. Es wird nur vermerkt, dass die Probe „von einem Tuberkulosepatienten“ stammt. Nachdem Sie die Speichelprobe abgegeben haben, wird diese im Forschungszentrum Borstel tiefgekühlt eingelagert. Das Probenröhrchen trägt eine Nummer, die es jedoch nicht ermöglicht, Sie zu identifizieren. Die Probe ist anonymisiert. Daher sind weder eine Datenlöschung noch eine Probenvernichtung möglich, wenn Sie Ihre Einwilligung später widerrufen möchten. Die Probe wird nur für die oben beschriebene Untersuchung benutzt und nicht für andere Zwecke genutzt oder gelagert.

An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Sie haben die Gelegenheit zu weiteren Gesprächen mit Dr. Herzmann, um weitere Fragen zu klären. Bitte geben Sie uns bei Speichelspende Bescheid, wenn Sie dies wünschen.



Ihr Prüfzentrum

Forschungszentrum Borstel, Klinisches Studienzentrum, Parkallee 35, 23845 Borstel
Tel. 04537-188-8080
Dr. Christian Herzmann

Speichelsammlung für das Projekt TuberChewLosis

Probandeninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, eine Speichelprobe (5ml) für ein wissenschaftliches Projekt zu spenden. Ihre Teilnahme an diesem Forschungsprojekt ist freiwillig.

Was soll untersucht werden?

Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die die Lunge befallt und schädigt. Wir versuchen, eine Methode zu entwickeln, mit der diese Bakterien im Speichel nachgewiesen werden können. Ihre Speichelprobe wird hierfür als Kontrolle benötigt. Es gibt keine Hinweise darauf, dass Sie an Tuberkulose leiden.

Welche Untersuchungen sind geplant und was geschieht mit den Speichelproben?

Wir bitten Sie, ca. 5 ml Speichel in ein steriles Röhrchen zu füllen, das Sie von uns erhalten. Bitte nicht abhusten, sondern nur Speichel aus der Mundhöhle „zusammensaugen“. Anschließend wird der Speichel mit dem Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* beimpft und untersucht.

Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Die Abgabe der Speichelprobe ist ohne Risiko. Insbesondere besteht keine Gefahr, sich mit Tuberkulose anzustecken. Es werden keine persönlichen oder gesundheitsbezogenen Daten erhoben. Es wird nur vermerkt, dass die Probe „von einem gesunden Probanden“ stammt. Nachdem Sie die Speichelprobe abgegeben haben, wird diese im Forschungszentrum Borstel tiefgekühlt eingelagert. Das Probenröhrchen trägt eine Nummer, die es jedoch nicht ermöglicht, Sie zu identifizieren. Die Probe ist anonymisiert. Daher sind weder eine Datenlöschung noch eine Probenvernichtung möglich, wenn Sie Ihre Einwilligung später widerrufen möchten. Die Probe wird nur für die oben beschriebene Untersuchung benutzt und nicht für andere Zwecke genutzt oder gelagert.

An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Sie haben die Gelegenheit zu weiteren Gesprächen mit Dr. Herzmann, um weitere Fragen zu klären. Bitte geben Sie uns bei Speichelspende Bescheid, wenn Sie dies wünschen.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Christian Herzmann und meinem Betreuer PD Dr. Norbert Reiling danken. Dir Norbert, für die engagierte und zeitaufwändige Betreuung, vielen Tipps, hilfreichen Diskussionen und dein Freitags-Motivations-Franzbrötchen. Danke Christian, für die sehr intensiven, klaren und zielführenden Besprechungen, die mir jedes Mal weitergeholfen haben. Durch die Chance aufgrund der Doktorarbeit Vorträge zu halten und Konferenzen zu besuchen, konnte ich nicht nur meinen fachlichen Horizont, sondern auch meinen persönlichen erweitern.

Herzlichen Dank für das Stipendium des Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).

Ohne die Hilfestellung und die Einführung in die experimentellen Arbeiten von Dr. Julius Brandenburg, Dr. Victoria Sohst, Carolin Golin, Lisa Niwinski und Svenja Goldenbaum, hätten meine Versuche definitiv nicht so gut funktioniert. Danke für eure Ideen, die viele Hilfe und Ratschläge.

Vielen Dank an Dr. Katharina Kolbe, Dr. Sven Malm, Julia Zallet, Dr. Doris Hillemann und Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller für die produktive Kooperation. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht und Ihre Expertise hat mein Projekt bereichert.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. König, die mir mit der statistischen Auswertung geholfen hat und an Frau Prof. Dr. Scherließ, die die Testung der Viskositätsreduktion ermöglichte.

Ganz herzlich möchte ich meinen Eltern, Ursula und Manfred Hansen, danken. Dafür, dass ihr mich nicht nur in der Doktorarbeit, sondern in meinem ganzen Werdegang unterstützt, euch meiner Probleme annehmt und mir mein Studium und auch die Promotion ermöglicht habt.

Vielen Dank auch Claudia Hansen, Katharina Schulze Dieckhoff, Laura Hochgürtel und Annika Freund, für eure Unterstützung. Danke für die Anmerkungen, Verbesserungsvorschläge und eure ehrliche Meinung, bei allen Fragen, die ich an euch hatte. Danke auch an Joris Korf und Christina Gerecke für das Ausmerzen meiner Rechtschreibfehler und den kreativitäts-fördernden Freizeitausgleich.

9 Quellen

1. Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose. Berliner Klinische Wochenschrift. 1882;428–45.
2. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. 1998;396:27.
3. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2015 [Internet]. [cited 2018 Apr 9];Available from: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2015.pdf?__blob=publicationFile
4. WHO | Global tuberculosis report 2018 [Internet]. [cited 2019 Mar 3];Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
5. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.
6. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2015 [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2015.pdf;jsessionid=3CBA5F61C7536CD7F433EA7E22D9C294.2_cid381?__blob=publicationFile
7. Wieler LH. Kommentar anlässlich des Welttuberkulosetags. 2016;
8. Koch-Institut R. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2017. :102.
9. Implementing the end TB strategy: the essentials. [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: https://www.who.int/tb/publications/2015/end_tb_essential.pdf?ua=1
10. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015 [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: https://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf?ua=1
11. RKI - RKI-Ratgeber - Tuberkulose [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html
12. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood Pulmonary Tuberculosis: Old Wisdom and New Challenges. Am J Respir Crit Care Med 2006;173(10):1078–90.
13. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. :11.
14. Barben J, Hammer J. Diagnostik und Therapie der latenten Tuberkuloseinfektion beim Kind. 2007;18(3):6.
15. Ending tuberculosis in children [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: [https://www.who.int/tb/challenges/childhood_tb_informationsheet.pdf?ua=1%20\(World%20Health%20Organization.%20Global%20tuberculosis%20report%202016\)](https://www.who.int/tb/challenges/childhood_tb_informationsheet.pdf?ua=1%20(World%20Health%20Organization.%20Global%20tuberculosis%20report%202016))
16. Diagnosis of Childhood Tb [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: [https://www.who.int/tb/challenges/ChildhoodTB_section2.pdf?ua=1%20\(WHO%202016\)](https://www.who.int/tb/challenges/ChildhoodTB_section2.pdf?ua=1%20(WHO%202016))

17. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The Tuberculin Skin Test. *Clinical Infectious Diseases* 1993;17(6):968–75.
18. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? :13.
19. Tamashiro VG, Perez HH, Griffin DE (1987) Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr Infect Dis J* 6(5):451–454.
20. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, et al. Prospective Evaluation of a Whole-Blood Test Using Mycobacterium tuberculosis-Specific Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Diagnosis of Active Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2005;12(4):491–6.
21. van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and Vaccine Immunology* 2000;7(2):155–60.
22. Diel R, Loytved G, Nienhaus A, et al. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* 2011;65(06):359–78.
23. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: A Radiologic Review. *RadioGraphics* 2007;27(5):1255–73.
24. Skoura E, Zumla A, Bomanji J. Imaging in tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases* 2015;32:87–93.
25. P. Van Dyck, F.M. Vanhoenacker, P. Van den Brande, A.M. De Schepper Imaging of pulmonary tuberculosis *Eur Radiol*, 13 (2003), pp. 1771-1785.
26. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children: This Official Statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was Adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This Statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4):1376–95.
27. Kim WS, Moon WK, Kim IO, et al. Pulmonary tuberculosis in children: evaluation with CT. *American Journal of Roentgenology* 1997;168(4):1005–9.
28. J.G. Im, H. Itoh, Y.S. Shim, J.H. Lee, J. Ahn, M.C. Han, et al. Pulmonary tuberculosis: CT findings—early active disease and sequential change with antituberculous therapy, 186 (1993), pp. 653-660.
29. E.B. Hoffman, J.H. Crosier, B.J. Cremin Imaging in children with spinal tuberculosis: a comparison of radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging *J Bone Joint Surg Br*, 75 (1993), pp. 233-239.
30. Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science* 2010;328(5980):852–6.
31. Vorster, M., Sathekge, M. M., Bomanji, J., Advances in imaging of tuberculosis: the role of 18F-FDG PET and PET/CT, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*: May 2014, Volume 20, Issue 3, p 287–293.
32. MIQ 5: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik; Podbielski, A.; Herrmann, M.; Kniehl, E.; Mauch, H.; Rüssmann, H. (Hrsg.) Heft Tuberkulose / Mykobakteriose; Autoren: Richter, E.; Beer, J.; Diel, R.; Hillemann, D.;

- Hoffmann, H.; Klotz, M.I.; Mauch, H.; Rüscher-Gerdes, S.; ISBN: 978-3-437-41531-9; 2. Aufl. 2010.
33. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New Diagnostic Methods for Tuberculosis. 2014;15.
 34. Parsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C, et al. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clinical Microbiology Reviews* 2011;24(2):314–50.
 35. Silver H, Sonnenwirth AC, Alex N. Modifications in the fluorescence microscopy technique as applied to identification of acid-fast bacilli in tissue and bacteriological material. *Journal of Clinical Pathology* 1966;19(6):583–8.
 36. S. Kommareddi, C. R. Abramowsky, G. L. Swinehart, L. Hrabak, Nontuberculous mycobacterial infections: Comparison of the fluorescent auramine-o and Ziehl-Neelsen techniques in tissue diagnosis, *Human Pathology* Volume 15, Issue 11, November 1984, Pages 1085-1089.
 37. Varughese P, Helbecque DM, McRAE KB, Eidus L. Comparison of strip and Ziehl-Neelsen methods for staining acid-fast bacteria. :9.
 38. Steingart, K. R. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 6, 664-674 (2006).
 39. Toman K, Frieden TR. Toman's tuberculosis: case detection, treatment and monitoring ; questions and answers. 2.ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
 40. *Ärzteblatt Sachsen* 3/2018. 2018;31.
 41. Hong Kong Chest Service/Tuberculosis Research Centre, Madras/British Medical Research Council. A study of the characteristics and course of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Tubercle*. 1981;62:155–67.
 42. Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel. Ergebnisbericht zur Studie „Vorkommen von Mycobakterien in wassergemischten Kühlschmierstoff“. 2004;9.
 43. Cross-infection Control, Bug bulletin: update on Mycobacterium tuberculosis, *Dental Nursing*, Vol. 5, No. 6, 28.09.2013.
 44. Tortoli E, Mandler F, Tronci M, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Löwenstein—Jensen medium. *Clinical Microbiology and Infection* 1997;3(4):468–73.
 45. Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M. Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections: New Tools and Lessons Learned. *CLIN INFECT DIS* 2001;33(6):834–46.
 46. Zhang Q, Zhou C. Comparison of laboratory testing methods for the diagnosis of tuberculous pleurisy in China. *Sci Rep* 2017;7(1):4549.
 47. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE* 2008;3(2):e1536.

48. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006;61(9):783–90.
49. World Health Organization, Regional Office for Europe. Algorithm for laboratory diagnosis and treatment-monitoring of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis using state-of-the-art rapid molecular diagnostic technologies: expert opinion of the European Tuberculosis Laboratory Initiative core group members for the WHO European Region. World Health Organization, Regional Office for Europe; 2017.
50. Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11(2):122–30.
51. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, et al. GenoType MTBDRplus Assay for Molecular Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46(11):3660–7.
52. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med* 2010;363(11):1005–15.
53. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):229–37.
54. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med* 2010;363(11):1005–15.
55. Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay [Internet]. [cited 2019 Oct 3]; Available from: https://www.who.int/tb/laboratory/xpert_faqs.pdf
56. Sohn H, Pai M, Dendukuri N, Kloda LA, Boehme CC, Steingart KR. Xpert MTB/RIF test for detection of pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance [Internet]. In: The Cochrane Collaboration, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [cited 2019 Oct 5]. p. CD009593. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009593>
57. *Clinical Tuberculosis*, Davies, 4. Edition, 2008, S.80.
58. Cordova J, Shiloh R, Gilman RH, et al. Evaluation of Molecular Tools for Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Stool Specimens from Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(5):1820–6.
59. Mello FC de Q, Bastos LG do V, Soares SLM, et al. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2006;6(1):43.
60. Hensler NM, Spivey CG, Jr, Dees TM. The use of hypertonic aerosol in production of sputum for diagnosis of tuberculosis. Comparison with gastric specimens. *Dis Chest*. 1961;40:639–42.
61. Ruiz Jiménez M, Guillén Martín S, Prieto Tato LM, et al. “Induced sputum versus gastric lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children.” *BMC Infect Dis* 2013;13(1):222.

62. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997;52(6):498–501.
63. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Geneva: World Health Organization; 2015.
64. McWilliams T. Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2002;57(12):1010–4.
65. Rao G, Venu M, Rani N, Sravani M. Induced sputum versus bronchial washings in the diagnosis of sputum negative pulmonary tuberculosis. *J Family Med Prim Care* 2016;5(2):435.
66. Hartung TK, Maulu A, Nash J, Fredlund VG. Suspected pulmonary tuberculosis in rural South Africa – Sputum induction as a simple diagnostic tool? *S Afr Med J.* 2002;92:455–8.
67. Tötsch M, Guzman J, Theegarten D, Schmid KW, Costabel U. Bronchoalveoläre Lavage. *Pathologe* 2007;28(5):346–53.
68. Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al. Bronchoalveolar Lavage Enzyme-linked Immunospot for a Rapid Diagnosis of Tuberculosis: A Tuberculosis Network European Trialsgroup Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(7):666–73.
69. Bachh A, Gupta R, Haq I, Varudkar H. Diagnosing sputum/smear-negative pulmonary tuberculosis: Does fibre-optic bronchoscopy play a significant role? *Lung India* 2010;27(2):58.
70. Chawla R, Pant K, Jaggi OP, Chandrashekhar S, Thukral SS. Fiberoptic bronchoscopy in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J.* 1988;1:804–6.
71. Charoenratanakul S, Dejsomritrutai W, Chaiprasert A. Diagnostic role of fiberoptic bronchoscopy in suspected smear negative pulmonary tuberculosis. *Respiratory Medicine* 1995;89(9):621–3.
72. Fujii H, Ishihara J, Fukaura A, Kashima N, Tazawa H, Nakajima H, et al. Early diagnosis of tuberculosis by fibreoptic bronchoscopy. *Tuber Lung Dis.* 1992;73:167–9.
73. Arbeitsgruppe AWMF-Leitlinie Tuberkulose im Kindes- und Jugendalter: Diagnostik, Prävention und Therapie, Ritz N, Brinkmann F, Feiterna-Sperling C, Hauer B, Haas W. Tuberkulosescreening bei asylsuchenden Kindern und Jugendlichen < 15 Jahren in Deutschland: Stellungnahme der Arbeitsgruppe AWMF-Leitlinie Tuberkulose im Kindes- und Jugendalter: Diagnostik, Prävention und Therapie unter Federführung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie. *Monatsschr Kinderheilkd* 2015;163(12):1287–92.
74. Connell T, Tebruegge M, Ritz N, Curtis N (2009) Interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 28(8):758–759.
75. Connell TG. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 2006;61(7):616–20.
76. Mulenga H, Moyo S, Workman L, Hawkridge T, Verver S, Tameris M et al (2011) Phenotypic variability in childhood TB: implications for diagnostic endpoints in tuberculosis vaccine trials. *Vaccine* 29(26):4316–4321.

77. Marais BJ, Pai M. Specimen collection methods in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2006;24(4):249.
78. Zar H, Tannenbaum E, Apolles P, Roux P, Hanslo D, Hussey G. Sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in infants and young children in an urban setting in South Africa. *Archives of Disease in Childhood* 2000;82(4):305.
79. Owens S, Abdel-Rahman IE, Balyejusa S, et al. Nasopharyngeal aspiration for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Archives of Disease in Childhood* 2007;92(8):693–6.
80. Hatherill M, Hawkrigde T, Zar HJ, et al. Induced sputum or gastric lavage for community-based diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis? *Archives of Disease in Childhood* 2009;94(3):195–201.
81. Zar H. J., Hanslo D., Apolles P., Swingler G., Hussey G., Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study, *The Lancet*, Volume 365, Issue 9454, P130-134, 2005.
82. Neild N, Dunkley EV. The role of the saliva in the transmission of tubercle. 1909;*Lancet*(173):1096–8.
83. Yeager Jr H, Lacy J, Smith LR, Lemaistre CA. Quantitative Studies of Mycobacterial Populations in Sputum and Saliva 1, 2. *American Review of Respiratory Disease* 1967;95(6):998–1004.
84. Holani AG, Ganvir SM, Shah NN, et al. Demonstration of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum and Saliva Smears of Tuberculosis Patients Using Ziehl Neelsen and Flurochrome Staining- A Comparative Study. *J Clin Diagn Res* 2014;8(7):ZC42–5.
85. (Munot) PPL, Mhapuskar AA, Ganvir SM, Hazarey VK, Mhapuskar MA, Kulkarni D. Detection of Acid Fast Bacilli in Saliva using Papanicolaou Stain Induced Fluorescence Method Versus Fluorochrome Staining: An Evaluative Study. *J Int Oral Health* 2015;7(7):115–20.
86. González Mediero G, Vázquez Gallardo R, Pérez del Molino M, Diz Dios P. Evaluation of two commercial nucleic acid amplification kits for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in saliva samples. *Oral Dis* 2015;21(4):451–5.
87. Yassen G, Noori J, Yas NS. Detection of acid fast bacilli in the saliva of patients having pulmonary tuberculosis. *J Bagh Coll Dent*. 2012; 24(3): 59–62. Available from: <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=70088>
88. Eguchi J., Ishihara K., Watanabe A., Fukumoto Y., Okuda K., PCR method is essential for detecting Mycobacterium tuberculosis in oral cavity samples, *Oral Microbiology and Immunology*, Volume18, Issue3, June 2003, Pages 156-159.
89. Rabe O, Chanteau S, Marchal G, Rasolofo Razanamparany V,Diagnosis of tuberculosis by immunocapture of the tuberculous bacillus (using magnetic beads, *Arch Inst Pasteur Madagascar*. 2001;67(1-2):37-40.
90. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from Milk by Immunomagnetic Separation. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 1998;64:6.
91. Sweeney FP, Courtenay O, Ul-Hassan A, Hibberd V, Reilly LA, Wellington EMH. Immunomagnetic recovery of Mycobacterium bovis from naturally infected environmental samples. *Lett Appl Microbiol* 2006;43(4):364–9.

92. Hunter DM, Lim DV. An IMS/ATP Assay for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Urine. *Tuberculosis Research and Treatment* 2012;2012:1–7.
93. Arutyunov D, Singh U, El-Hawiet A, et al. Mycobacteriophage cell binding proteins for the capture of mycobacteria. *Bacteriophage* 2014;4(4):e960346.
94. Garbaccio, S. G., Cataldi, A. A. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol* 42, 247-253 (2010).
95. Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach G-F. Development of a Peptide-Mediated Capture PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40(11):4244–50.
96. Dissertation Dr. Katharina Kolbe, 2016.
97. Steinhäuser C, Heigl U, Tchikov V, et al. Lipid-Labeling Facilitates a Novel Magnetic Isolation Procedure to Characterize Pathogen-Containing Phagosomes. *Traffic* 2013;14(3):321–36.
98. Reiling N, Homolka S, Walter K, et al. Clade-Specific Virulence Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains in Human Primary Macrophages and Aerogenically Infected Mice. *mBio* 2013;4(4):e00250-13.
99. Zelmer A, Carroll P, Andreu N, et al. A new in vivo model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;67(8):1948–60.
100. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages [Internet]. In: Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editors. *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2019 Oct 5]. p. im1401s83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1401s83>
101. Hillemann D, Warren R, Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Strains by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):302–6.
102. Real PCR Application Guide [Internet]. [cited 2019 Oct 3]; Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
103. McLennan AG, Häcker B, editors. *Molekularbiologie: für Biologen, Biochemiker, Pharmazeuten und Mediziner*. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2013.
104. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
105. Burkhart CA, Norris MD, Haber M. A simple method for the isolation of genomic DNA from mouse tail free of real-time PCR inhibitors. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2002;52(2):145–9.
106. Zangala T. Isolation of Genomic DNA from Mouse Tails. *JoVE* 2007;(6):246.
107. Konigsberg W., Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol, *Methods in Enzymology* Volume 25, 1972, Pages 185-188.

108. Behra M, Azzouz N, Schmidt S, et al. Magnetic Porous Sugar-Functionalized PEG Microgels for Efficient Isolation and Removal of Bacteria from Solution. *Biomacromolecules* 2013;14(6):1927–35.
109. Wilson S, Lane A, Rosedale R, Stanley C. Concentration of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum using ligand-coated magnetic beads. :5.
110. Stanley, C. J., Wilson, S. M. Capture of micro-organisms. US Patent EP2588863 A1 filed 29 Jun. 2011, and issued 8 Mai. 2013.
111. Ghodbane R, Drancourt M. Magnetic Bead Protocol for Culturing *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2013;51(5):1578–9.
112. Wang X, Zhao L, Yu X, et al. Bead capture increases the sensitivity of sputum microscopy for the diagnosis of tuberculosis in Beijing, China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2013;107(11):741–3.
113. Carr, S. W., Pickup, K. M., Smith, P. M., Schilling, K. M. Oral care compositions. US Patent 5824292 filed 12 Apr. 1996, and issued 20 Oct. 1998.
114. Lau, A., Eason, R., Brevnow, M., Li, H., Hacker, K. Magnetic beads having surface glycoconjugates and use thereof. US Patent PCT/US2011/048693 filed 22 Aug. 2011, and issued 23 Feb. 2012.
115. Qi, Z. et al. Multivalency at interfaces: supramolecular carbohydrate-functionalized graphene derivatives for bacterial capture, release, and disinfection. *Nano Lett* 15, 6051-6057 (2015).
116. Hartmann, M. et al. Saccharide-modified nanodiamond conjugates for the efficient detection and removal of pathogenic bacteria. *Chemistry* 18, 6485-6492 (2012).
117. Gazouli M, Liandris E, Andreadou M, et al. Specific Detection of Unamplified *Mycobacterial* DNA by Use of Fluorescent Semiconductor Quantum Dots and Magnetic Beads. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(8):2830–5.
118. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Bonetto S, Nebuloni M, Costanzi G. Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR. *Molecular Pathology* 1999;52(3):158–60.
119. Bordelon H, Russ PK, Wright DW, Haselton FR. A Magnetic Bead-Based Method for Concentrating DNA from Human Urine for Downstream Detection. *PLoS ONE* 2013;8(7):e68369.
120. Thielbeer, F., Donaldson, K., Bradley, M. Zeta potential mediated reaction monitoring on nano and microparticles. *Bioconjugate Chem* 22, 144-150 (2011).
121. Kang, E. T., Tan, K. L., Kato, K., Uyama, Y., Ikada, Y. Surface modification and functionalization of polytetrafluoroethylene films. *Macromolecules* 29, 6872-6879 (1996).
122. TB-Beads TBRP Instructions for Use, Microsens Diagnostics [Internet]. [cited 2019 Oct 3]; Available from: <https://microsensbp.com/wp-content/uploads/2015/11/SOPMM22.2-TBRP.pdf>
123. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New Diagnostic Methods for Tuberculosis. 2014;15.

124. Cordova J, Shiloh R, Gilman RH, et al. Evaluation of Molecular Tools for Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Stool Specimens from Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(5):1820–6.
125. Diel R, Loytved G, Nienhaus A, et al. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* 2011;65(06):359–78.
126. Sanares, A. M. E., King, N. M., Itthagarun, A., Wong, H. M. Chewing gum as a medium for the delivery of anticariogenic therapeutic agents: a review. *Hong Kong Dent J* 6, 13-22 (2009).
127. Imfeld, T. Chewing gum - facts and fiction: A review of gum-chewing and oral health. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 405-419 (1999).
128. Meinel, L., Schnabelrauch, M., Schlottig, F. Diagnostic chewing gum for pathogens. Patent WO2013132058 filed 8 Mar. 2012, and issued 12 Sep. 2013.
129. Allen, N. Microsoft's Bill Gates invests in chewing gum and chocolate in fight against malaria. *The Telegraph* (2009).
130. Deutsches Ärzteblatt: Archiv "Oral-transmukosales therapeutisches System von Elan Pharma" (22.03.2002) [Internet]. [cited 2019 Oct 3];Available from: <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=30966>
131. Taddio A, Pollock N, Gilbert-MacLeod C, Ohlsson K, Koren G. Combined Analgesia and Local Anesthesia to Minimize Pain During Circumcision. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000;154(6):620–623.
132. Greenberg, Cindy Smith. "A sugar-coated pacifier reduces procedural pain in newborns." *Pediatric nursing* 28 3 (2002): 271-7 .
133. Bwanga F, Disqué C, Lorenz MG, et al. Higher blood volumes improve the sensitivity of direct PCR diagnosis of blood stream tuberculosis among HIV-positive patients: an observation study. *BMC Infect Dis* 2015;15(1):48.
134. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, et al. Rapid Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2015;53(7):2230–7.
135. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L. Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2017;55(5):14.
136. Kretzer J, Schmelcher M, Loessner M. Ultrasensitive and Fast Diagnostics of Viable *Listeria* Cells by CBD Magnetic Separation Combined with A511::luxAB Detection. *Viruses* 2018;10(11):626.