NOVARTIS
VACCINES AND
DIAGNOSTICS

Philipps Universität Marburg

Etablierung einer PCR-basierten Methode zur Detektion von *Mollicutes*

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von Anne Broge

aus Minden

Marburg (Lahn), Mai 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2009 bis April 2012 bei Novartis Vaccines & Diagnostics in Marburg (Lahn) unter der Leitung von Dr. Dana Kemnitz von Novartis Vaccines & Diagnostics sowie Prof. Dr. Johann Heider von der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am: 24.Mai.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Conrad

Tag der Disputation: 06. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

Abstract V

Zusammenfassung VI

1 Einleitung 1

1.1 Einführung in die Klasse der *Mollicutes* 1

1.2 Die Bedeutung der *Mollicutes* für Industrie und Forschung 5

1.3 Regulatorische Vorgaben für Impfstoffhersteller 8

1.4 Vergleich der klassischen und PCR-basierten Methoden zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* 10

1.5 Anforderungen an eine PCR-basierte Methode zur Detektion von *Mollicutes* für die Chargenfreigabe von Impfstoffen 11

1.6 Ziel dieser Arbeit 13

2 Material und Methoden 14

2.1 Verbrauchsmaterialien 14

2.2 Geräte 15

2.3 Probenmaterial 16

2.4 Mikroorganismen 17

2.5 Mikrobiologische Methoden 19

2.6 Molekularbiologische Methoden 22

2.7 PCR-basierte Methoden zur Detektion von *Mollicutes* 28

3 Ergebnisse 35

3.1 Auswahl einer geeigneten Testmethode 35

3.2 Etablierung von *Mollicutes* Referenzstandards 38

3.3 Evaluierung der ausgewählten Methode als Prüfverfahren zur Chargenfreigabe 52

3.4 Messung der Nachweisgrenze des Kultivierungstests 64

3.5 Quantifizierung der Detektion freier, nicht zellgebundener DNA 65

3.6 Analysen zur Bewertung der Testsicherheit 67

4 Diskussion 74

4.1 Die Auswahl einer geeignete Methode 75

4.2 Etablierung von *Mollicutes*-Referenzstandards 77

4.3 Evaluierung der Detektion von *Mollicutes* 83

4.4 Evaluierung der Spezifität und Robustheit der Methode 88

4.5 Bewertung der Testsicherheit 89

5 Fazit 92

6 Literaturverzeichnis 93

Eidesstattliche Erklärung 101

Danksagung 102

Wissenschaftlicher Werdegang der Autorin 103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMG	Arzneimittelgesetz
AMWHV	Arzneimittel und Wirkstoff Herstellungsverordnung
ATCC	American Typ Culture Collection
bp	Basenpaare
Cy5	Cyanine 5
CFR	Code of Federal Regulations
CHO	Chinese Hamster Ovary
CV	Variation Coefficient
ddNTPs	Didesoxinukleotidtriphosphat
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTPs	Desoxinukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
E.P.	Europäische Pharmakopöe (Europäisches Arzneibuch)
EMA	European Medicines Agency
ePK	Externe Positivkontrolle
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCC	Flu Cell Culture
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBO	Greiner Bio-One
GC	Genome Copies (dt.: Genomkopien)
GMP	Good Manufacturing Practice
IPA	Isopropylalkohol (2-Propanol)
iPK	Interne Positivkontrolle
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheiten
LIMS	Laboratory Information Management System
LZZ	Lebendzellzahl

MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MW	Mittelwert
NCTC	National Collection of Type Cultures
NTC	Non Template Control
NVD	Novartis Vaccines & Diagnostics
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt.: Polymerase Kettenreaktion)
PDA	Parental Drug Association
RNA	Ribonucleic Acid (dt.: Ribonukleinsäure)
rpm	Revolutions Per Minute
rRNA/ rDNA	Ribosomal Ribonucleic Acid/ ribosomal Desoxiribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNR	Signal to Noise Ratio (dt.: Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen)
SOP	Standard Operating Procedure, dt. Standard Arbeitsanweisung
SPF	Specified Pathogen Free
T_M	Melting Temperature (dt.: Schmelztemperatur)
USP	United States Pharmacopoeia (Arzneibuch der Vereinigten Staaten)
UV	Ultraviolett

Abstract

A PCR-based method for detecting the absence of mycoplasmas (*Mollicutes*) was established in the laboryitories of the microbiological quality control of Novartis Vaccines & Diagnostics (NVD) in Marburg in this doctoral thesis. The objective was to create the bases for the subsequent validation and approval of this method by the authorities, so that both the test methods currently used for the release of vaccines (cultivation test and indicator cell test in accordance with the European Pharmacopoeia) can be replaced by the new procedure.

To this end the most suitable method for the PCR-based detection of *Mollicutes* was the CytoInspect™ System made by Greiner Bio-One GmbH, the principle of which is based on a touchdown PCR, followed by a microarray analysis for the detection and identification of PCR products. Three ready-to-use kits were considered in direct comparison. The main criteria were the sensitivity measured in practical trials for samples with high cell ($>10^7$ cells/ml) and virus concentrations, the specificity, and the positive controls for monitoring the functionality of each individual test.

Reference standards for ten different *Mollicutes* species were established for the validation of the PCR-based procedure and comparison with the previous cultivation-based methods. These were aliquoted and deep-frozen cell suspensions. The main criterion for the suitability of these standards was the lowest and most uniform ratio possible of gene copies (GC) per colony forming unit (CFU) in the individual aliquots of the respective cell suspensions. All ten reference standards exhibited a stable titer (CFU/ml) and a ratio of < 20 GC/CFU.

The sensitivity of the CytoInspect™ Kit was determined in the form of the detection limit. For the ten *Mollicutes s*pecies tested in this study this lay between 22 and 0.5 GC/ml (which corresponded to 4.5 – 0.1 CFU/ml), in a sample volume of 10 ml. It was comparable with the detection limit of the cultivation test, which was measured in this study at 2 to 0.1 CFU/ml. Due to the likewise high sensitivity in the detection of free DNA from cells which had already died this method also offers the possibility of preventing living contaminations in the production facilities. The robustness of the procedure and the specific (exclusive) detection of *Mollicutes* with the CytoInspect™ Kit could be demonstrated by the practical tests.

The safety of the test procedure was assessed in the context of establishing the method as a routine application for the batch release of vaccines under the local conditions prevailing in the laboratories of the microbiological quality control of NVD in Marburg. This took place, on the one hand, through the evaluation of the critical steps which could lead to a false-negative result. On the other hand, the risk of false-positive results, which could occur due to contaminations of the samples during the conduction of the tests, was assessed and minimized through corresponding measures.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine PCR-basierte Methode zum Nachweis der Abwesenheit von Mykoplasmen (*Mollicutes*) in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle der Firma Novartis Vaccines & Diagnostics (NVD) am Standort Marburg etabliert. Ziel war es, die Grundlagen für die anschließende Validierung und Zulassung dieser Methode durch die Behörden zu schaffen, sodass beide, aktuell zur Freigabe der Impfstoffe verwendeten Test-Methoden (Kultivierungstest und Indikatorzelltest gemäß Europäischem Arzneibuch) durch das neue Verfahren ersetzt werden können.

Die hierfür am besten geeignete Methode zur PCR-basierten Detektion der *Mollicutes* war das CytoInspect™ System der Firma Greiner Bio-One, deren Prinzip auf einer touch-down PCR, gefolgt von einer Microarray Analyse zur Detektion und Identifizierung der PCR-Produkte, beruhte. Im direkten Vergleich wurden drei „ready-to-use"-Kits betrachtet. Die Hauptkriterien waren dabei die in praktischen Versuchen gemessene Sensitivität für Proben mit hohen Zell- ($>10^7$ Zellen/ml) und Viruskonzentrationen, die Spezifität und die Positivkontrollen zur Überwachung der Funktionalität jedes einzelnen Tests.

Für die Validierung des PCR-basierten Verfahrens und den Vergleich mit den bisherigen Methoden auf Kultivierungsbasis wurden Referenzstandards von zehn verschiedenen *Mollicutes*-Spezies etabliert. Es handelte sich dabei um aliquotierte und tiefgefrorene Zellsuspensionen. Das Hauptkriterium für die Eignung dieser Standards war ein möglichst niedriges und gleichmäßiges Verhältnis von Genkopien (GC) pro koloniebildender Einheit (KBE) in den einzelnen Aliquots der jeweiligen Zellsuspensionen. Alle zehn Referenzstandards wiesen einen stabilen Titer (KBE/ml) und ein Verhältnis von < 20 GC/KBE auf.

Die Sensitivität des CytoInspect™ Kits wurde in Form der Nachweisgrenze bestimmt. Für die zehn, in dieser Arbeit getesteten *Mollicutes*-Spezies lag sie zwischen 22 und 0,5 GC/ml (entsprach 4,5 - 0,1 KBE/ml), bei einem Probenvolumen von 10 ml. Sie war vergleichbar mit der Nachweisgrenze des Kultivierungstests, die in dieser Arbeit bei 2 bis 0,1 KBE/ml gemessen wurde. Durch die ebenfalls hohe Sensitivität bei der Detektion freier DNA von bereits abgestorbenen Zellen, bietet diese Methode zusätzlich die Möglichkeit zur Prävention lebender Kontaminationen in den Produktionsanlagen. Die Robustheit des Verfahrens und die spezifische (ausschließliche) Detektion von *Mollicutes* mit dem CytoInspect™ Kit konnten durch praktische Tests gezeigt werden.

Im Rahmen der Etablierung der Methode als Routineanwendung zur Chargenfreigabe von Impfstoffen unter den örtlichen Gegebenheiten in den Laboren der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von NVD in Marburg wurde die Sicherheit des Testverfahrens bewertet. Dies erfolgte zum einen durch die Evaluierung der kritischen Schritte, die zu einem falsch-negativen Ergebnis führen könnten. Zum anderen wurde das Risiko für falsch-positive Ergebnisse, die durch Kontaminationen der Proben während der Testdurchführung entstehen könnten, bewertet und durch entsprechende Maßnahmen minimiert.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Klasse der *Mollicutes*

Die Klasse der *Mollicutes* (lat.: *mollis* = weich, sanft; *cutis* = Haut), die allgemein mit dem Trivialnamen Mykoplasmen (engl. mycoplasma) bezeichnet wird, gehört innerhalb der Domäne der *Bacteria* zum Phylum der *Firmicutes* (lat. firmus = stark, fest; cutis = Haut) (Razin, 2006; Johansson & Pettersson, 2002). Hier findet man unter anderen auch die Klassen der *Bacilli* und *Clostridia* (Weisburg, et al., 1989). Die überwiegende Zahl der Bakterien im Phylum *Firmicutes* haben zwei Charakteristika: 1. sie zeigen einen niedrigen GC-Gehalt der chromosomalen DNA, der im Fall der *Mollicutes* zwischen 23 und 40 % liegt; 2. sie sind gram-positive Bakterien. Eine der Ausnahmen sind die *Mollicutes,* die aufgrund der gänzlich fehlenden Zellwand nicht den Gram-positiven zugeordnet werden können. (Woese, et al., 1980; Razin, et al., 1998; Dworkin, et al., 2006). Der fehlenden Zellwand verdanken die *Mollicutes* auch ihren Namen, da sie keine feste Zellhülle aufweisen, sondern lediglich von der Zytoplasmamembran umschlossen werden. Die phylogenetische Zuordnung beruht auf dem Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens (Weisburg, et al., 1989). Demzufolge stammen die *Mollicutes* ursprünglich von einem Vorfahren der *Streptococcen* ab, deren Genomgröße üblicherweise 1700 – 2600 kb beträgt. Seit der Entstehung der Klasse der *Mollicutes* vor ca. 600 Millionen Jahren haben die jeweiligen Arten ihr Genom mehr oder weniger stark reduziert. Ihre Genomgrößen liegen heute zwischen 600 kb und 1700 kb (Maniloff, 2002). Die *Mollicutes* gehören auf Grund ihrer kleinen Genome und geringen Zellgrößen (Ø = 0,3 - 0,8 µm) zu den kleinsten, selbstreplizierenden Organismen die wir kennen (Razin & Hayflick, 2010).

Tabelle 1.1: Die neun rezenten *Mollicutes*-Gattungen und ihre Hauptmerkmale (Razin, et al., 1998)

Gattung	**Besondere Eigenschaft**	**Cholesterinbedarf**	**Habitat**
Mycoplasma	Temperaturoptimum 37°C	Ja	Menschen/ Tiere
Ureaplasma	Urease positiv	Ja	Menschen/ Tiere
Entomoplasma	Temperaturoptimum 30°C	Ja	Insekten/ Pflanzen
Mesoplasma	Temperaturoptimum 30°C	Nein	Insekten/ Pflanzen
Spiroplasma	Spiralförmige Morphologie	Ja	Insekten/ Pflanzen
Acholeplasma	Temperaturoptimum 30 - 37°C	Nein	Tiere/ Insekten/ einige Pflanzen
Anaeroplasma	Obligat anaerob	Ja	Rinder-/ Schafpansen
Asteroleplasma	Obligat anaerob	Nein	Rinder-/ Schafpansen
Phytoplasma	Unkultivierbar in vitro	Unbekannt	Insekten/ Pflanzen

Die *Mollicutes* werden **in neun Gattungen** unterteilt. Diese Gattungen können anhand weniger Merkmale, wie z.B. ihrem Temperaturoptimum, ihrem Cholesterinbedarf und ihrem natürlichen Habitat voneinander unterschieden werden (siehe Tabelle 1.1). Die mit Abstand artenreichste Gattung ist die der *Mycoplasma* mit über 100 beschriebenen Arten (Razin, et al., 1998; Johansson & Pettersson, 2002). Insgesamt gibt es bis heute über 200 verschiedene Spezies innerhalb der *Mollicutes* (Razin & Hayflick, 2010).

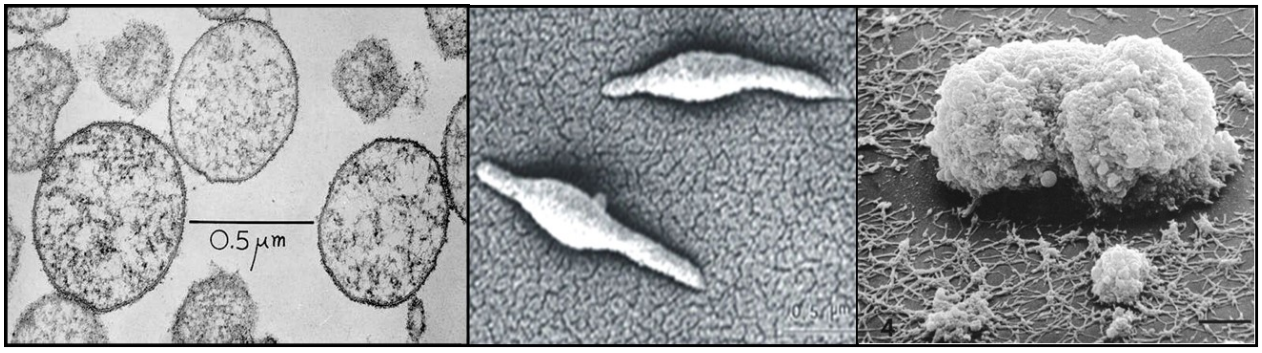


Abb. 1.1: Typische morphologische Formen der *Mollicutes*; von links nach rechts: runde bis ovale Zellformen (Razin & Hayflick, 2010); spindel-förmige Zellmorphologie von *M. pneumoniae* (Romero-Arroyo, et al., 1999); Filamente und Netzstruktur von *M. pneumoniae* (Biberfeld & Biberfeld, 1970)

Mollicutes zeigen aufgrund ihrer fehlenden Zellwand in der Regel eine runde bis ovale Morphologie. Es gibt aber auch einige Arten die spindel- oder birnenförmige Zellen ausbilden (Razin, et al., 1998). Von einigen Spezies wie z. B. *M. pneumoniae* ist sogar die Ausbildung von Filamenten und ganzen Netzstrukturen beschrieben (Biberfeld & Biberfeld, 1970) (Siehe Abb. 1.1). Auf festen Nährmedien bilden *Mollicutes* typische spiegeleiförmige Kolonien. Diese Form wird dadurch verursacht, dass die Zellen zunächst in den Nährboden hinein wachsen und sich erst nach einiger Zeit auch auf der Oberfläche ausbreiten (Meloni, et al., 1980) (siehe Abb. 1.2).

Die äußere Zellhülle der *Mollicutes* wird ausschließlich durch die Zytoplasmamembran gebildet. Im Vergleich zu anderen Eubakterien enthält sie einen sehr hohen Anteil an Lipoproteinen, die bis zu zwei Drittel der Membranmasse ausmachen (Razin, et al., 1998). Bei einigen *Mollicutes*, wie z. B. *M. gallisepticum,* spielen Variationen der Oberflächenproteine eine große Rolle als Antigene, bei der Adhäsion der *Mollicutes* an die Wirtszellen und für „molekulares Mimikry“, um dem Immunsystem ihres Wirts zu entkommen (Rottem & Naot, 1998; Athamna, et al., 1997; Winner, et al., 2003). Die Pathogenität der *Mollicutes* ist dabei unmittelbar an ihre Adhäsionsfähigkeit gekoppelt. Studien haben gezeigt, dass ein Verlust dieser Fähigkeit mit dem Verlust der invasiven Eigenschaft und der Pathogenität einhergeht (Much, et al., 2002; Somarajan, et al., 2010; Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte, 2008).

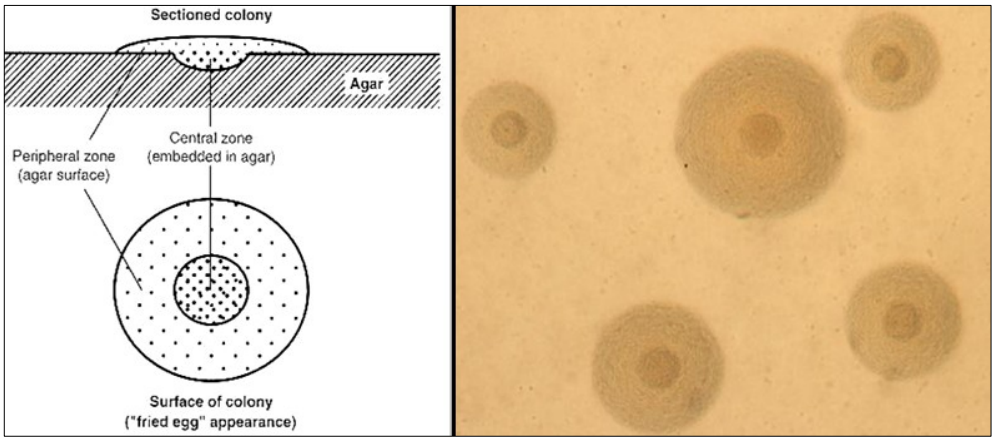


Abb. 1.2: Darstellung der typischen, spiegeleiförmigen *Mollicutes*-Kolonien auf festen Nährmedien; links: schematische Darstellung eines Querschnitts und der dazu gehörigen Aufsicht einer Kolonie. Die zentrale Zone wächst in den Nährboden, während die periphäre Zone darüber liegt. Dadurch erscheint die zentrale Zone im Lichtmikroskop dunkler. Je nach Art ist dieses „Spiegelei" mehr oder weniger ausgeprägt, bei einigen Arten ist es gar nicht zuerkennen (Razin, 1996); rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme von *M. pneumoniae* auf Friis-Agar. Foto aufgenommen von Mycosafe Diagnostics GmbH, Wien 2011.

Einzigartig unter den Bakterien ist ihr Bedarf an Cholesterin, dass sie zur Stabilisierung ihrer Zytoplasmamembran benötigen. Einzige Ausnahmen sind die Gattungen *Acholeplasma*, *Mesoplasma* und *Asteroleplasma,* die Cholesterin zwar in ihre Zellmembran einbauen können, aber nicht zwingend darauf angewiesen sind (Grabowski, et al., 1976; Abu-Amero, et al., 2005).

Mollicutes sind in der Tier- und Pflanzenwelt sehr weit verbreitet und bis auf wenige Ausnahmen alle kommensal bis parasitisch. Sie kommen beim Menschen genauso wie bei Säugetieren, Fischen, Reptilien, Arthropoden und Pflanzen vor (Razin & Hayflick, 2010; Brown, et al., 1995). Da sie keine Zellwand haben, reagieren die meisten sehr sensibel auf osmotische Veränderungen und sind auf feuchte Habitate angewiesen. In der Regel findet man sie bei Menschen und Tieren auf den Schleimhäuten der respiratorischen Organe und des Urogenitaltrakts. Im Fall von systemischen Infektionen konnten sie aber auch in den Lymphknoten, den Blutbahnen, den Augen, der Speiseröhre und den Gelenken nachgewiesen werden (Razin, 2006; Blanchard & Bébéar, 2002; Frey, 2002; Vogl, et al., 2008). Bei Insekten sind die Gattungen *Spiroplasma* und *Phytoplasma* meist im Verdauungstrakt, der Haemolymphe oder den Speicheldrüsen lokalisiert. Über Letztere findet die Übertragung auf Pflanzen statt, deren Phloem durch saugende Insekten mit *Spiroplasma* oder *Phytoplasma* infiziert wird (Gasparich, 2010; Seemueller, et al., 2002). Im Laufe ihrer Evolution haben sich die *Mollicutes* sehr stark an ihre Wirtsorganismen angepasst und dabei ihr eigenes Genom massiv reduziert. Bis auf wenige Ausnahmen, z. B. die Gattung *Acholeplasma*, sind die einzelnen Arten daher in hohem Maße auf ihren jeweils spezifischen Wirt angewiesen. Die Kultivierung auf künstlichen Medien oder Zellkulturen gestaltet sich daher für viele Arten der *Mollicutes* sehr schwierig oder sogar unmöglich.

Viele *Mollicutes* sind Teil der normalen, bakteriellen Flora des Wirts. Einige sind jedoch pathogen und können von lokalen bis hin zu systemischen Infektionen vielfältigste Krankheitsbilder verursachen. Eine der häufigsten pathogenen *Mycoplasma*-Arten bei Menschen und vielen Tieren ist *M. pneumoniae*. Der Erreger der atypischen Pneumoniae befällt vor allem den respiratorischen Trakt, führt aber auch häufig zu systemischen Erkrankungen mit Befall weiterer Organe (Sánchez-Vargas & Gómez-Duarte, 2008; Mariotti, et al., 2010). Aber auch *M. fermentans* wird oft mit chronischen Krankheiten wie AIDS und Arthritis in Verbindung gebracht (Afshar, et al., 2008; Sato, et al., 2010; Rivera, et al., 2002). In der Massentierhaltung kommt es immer wieder zu Ausbrüchen akuter Infektionen, da *Mollicutes* durch den permanenten direkten Kontakt der Tiere leicht übertragen werden können. So werden z. B. Hühner und Puten oft von *M. gallisepticum* und *M. synoviae* befallen (Kleven, 1998; Marois, et al., 2000).

Die Behandlung von *Mollicutes*-Infektionen mit Antibiotika ist sehr schwierig. Durch die Reduktion ihres Genoms sind sie in ihren metabolischen Fähigkeiten stark eingeschränkt und unterscheiden sich in vielen Eigenschaften von anderen Eubakterien. So haben z. B. ß-Laktame (z. B. Penicilline) oder Glykopeptide (z. B. Vancomycin), auf Grund der fehlenden Zellwand, keine Wirkung auf *Mollicutes* (Razin & Freundt, 1984). Antibiotika der MLSK-Gruppe (Makrolide-Lincosamide-Streptogramine-Ketolide), Fluoroquinolone und Tetrazykline haben dagegen auch bei *Mollicutes* einen Effekt. MLSK-Antibiotika inhibieren die Protein-Synthese indem sie an die 50S-Untereinheit der Ribosomen binden und dort die Peptidyltransferase-Aktivität stören. Die MLK-Antibiotika verhindern so die Verlängerung der Polypeptidketten an den Ribosomen. Die Streptogramine verhindern dagegen bereits die Bindung der tRNAs und führen so zum frühzeitigen Abbruch der Aminosäurekettenverlängerung. Tetrazykline inhibieren ebenfalls die Proteinsynthese, allerdings binden sie an die 30S-Untereinheit und verhindern die Bindung der Peptidyl-tRNAs an die Akzeptor-Position der Ribosomen. Die Bindung einiger dieser Antibiotika an die Ribosomen ist abhängig von wenigen Nukleotiden der rRNA-Sequenz. Bereits kleine Mutationen wie der Austausch einzelner Nukleotide der rRNA der *Mollicutes* kann dazu führen, dass solche Antibiotika nicht mehr an ihr Zielmolekül binden und ihre Wirksamkeit bei diesen Bakterien verlieren. Ein Beispiel dafür ist die Erythromycin-Resistenz von *M. hominis*, die durch den Austausch eines G durch ein A an der Position 2057 der 23S-rRNA verursacht wird. Diese Base liegt direkt neben den beiden Nukleotiden, die für die Bindung des Antibiotikums an die V-Domäne der 23S-rRNA notwendig sind (Position 2058 und 2059). In Folge des Austauschs kann Erythromycin nicht mehr an die Ribosomen binden (Bébéar & Pereyre, 2005; Török, et al., 2009).

Ein weiterer Grund für die nur schwer zu behandelnden Infektionen ist die Eigenschaft der *Mollicutes* sich nicht nur an die Oberfläche ihrer Wirtszellen zu heften, sondern auch durch die Zellmembran in das Innere der Zellen und Gewebe einzudringen (siehe Abb. 1.3). Dies wurde bereits bei einigen *Mycoplasma*, wie z. B. *M. fermentans, M. genitalium* und *M. gallisepticum* nachgewiesen. Letztere Art kann bis zu 48 Stunden intrazellulär nachgewiesen werden und sich auch in den Zellen vermehren (Vogl, et al., 2008; Winner, et al., 2000; Yavlovich, et al., 2004; Ueno, et al., 2008). Die Invasion der Zellen und Gewebe ermöglicht es den *Mycoplasma*-Zellen, sich vor dem wirtseigenen Immunsystem zu verbergen, sich einen besseren Zugang zu

Nährstoffen zu verschaffen und Gewebe zu durchdringen, um auch andere Organe des Wirtsorganismus zu besiedeln. Diese Eigenschaft ist sicher einer der Gründe für die sehr erfolgreiche, parasitäre Evolution der *Mollicutes* seit über 600 Millionen Jahren.

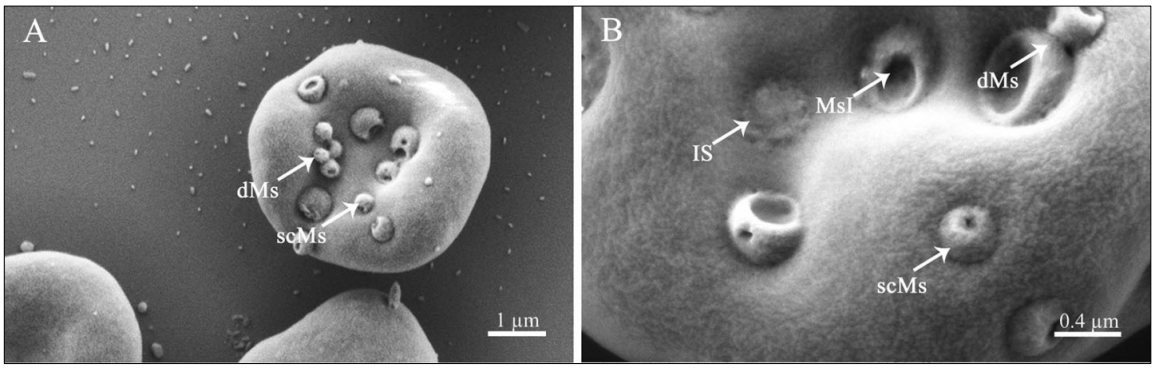


Abb. 1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Erythrozyten vom Schwein, infiziert mit *M. suis*. Zu sehen sind kleine, (A) kokkoide Zellen (scMs), sich teilende *M. suis* Zellen (dMs), (B) Zellen die durch Invagination in die Wirtszelle eindringen (MsI) und Narben in der Zellmembran des Erythrozyten, wo bereits eine Invagination stattgefunden hat (IS) (Groebel, et al., 2009).

1.2 Die Bedeutung der *Mollicutes* für Industrie und Forschung

Neben den sehr zahlreichen, natürlichen Habitaten der *Mollicutes* sind durch den Einsatz von Zellkulturen zusätzlich künstliche Lebensräume für diese Bakterien geschaffen worden. Zellkulturen bieten für die *Mollicutes* geradezu „paradiesische Zustände“, da das wirtseigene Immunsystem fehlt und viele der gängigen Antibiotika, die in der Zellkultur eingesetzt werden, wirkungslos sind. 1956 berichteten Robinson und Wichelhausen zum ersten Mal von „Pleuropneumoniae-like Organisms“ (später umbenannt in *Mollicutes*) in HeLa-Zellkulturen (Robinson & Wichelhausen, 1956).

Mit der Zunahme der verschiedensten Anwendungen für Zellkulturen stieg in den letzten Jahrzehnten auch die Zahl der detektierten Kontaminationen. Während Studien bis 1980 ca. 15 % kontaminierte Kulturen zählten, waren es bis 2002 im Schnitt bereits 15 – 35 % (Drexler & Uphoff, 2002). Tabelle 1.2 fasst die Ergebnisse von drei verschiedenen Studien der letzten sechs Jahre zusammen und gibt eine Übersicht über die jeweils gefundenen *Mollicutes*-Arten und ihre prozentuale Häufigkeit.

Die Daten zeigen, dass ca. 20 – 30 % aller untersuchten Zellkulturen mit *Mollicutes* kontaminiert waren (Timenetsky, et al., 2006; Kazemiha, et al., 2009; Drexler & Uphoff, 2002). Dabei waren scheinbar vor allem kontinuierliche Zelllinien stark betroffen (15 – 35 %), während primäre Zellkulturen und solche in den frühen Passagen weit seltener kontaminiert waren (1 – 5 %) (Drexler & Uphoff, 2002). Häufig wurden auch mehr als nur eine Spezies in den Kulturen entdeckt, dies war in 25 – 60 % der Fall (Timenetsky, et al., 2006; Kazemiha, et al., 2009). Insgesamt wurden ca. 20 verschiedene *Mollicutes*-Arten gefunden, von denen die in

Tabelle 1.2 genannten sieben Arten ca. 95 % der Fälle ausmachen (Drexler & Uphoff, 2002; Timenetsky, et al., 2006).

Die ursprünglichen Quellen der *Mollicutes* in Zellkulturen sind (1) kontaminierte, tierische und pflanzliche Rohstoffe, die zur Medienherstellung eingesetzt werden, wie z. B. Seren oder Peptone; (2) die primären Zellkulturen, wenn diese aus einem infizierten Organismus stammen; (3) der Operator, denn *Mollicutes* kommen auch in der oralen Flora des Menschen vor und werden von dort leicht verbreitet. Studien zwischen 1960 und 1970 haben ergeben, dass zu diesem Zeitpunkt ca. 25 – 40 % der in den Handel gelangten und untersuchten bovinen Seren kontaminiert waren. Diese Zahl konnte bis heute stark reduziert werden, indem zusätzliche Kontrollen bei den Herstellern eingeführt und betroffene Gebinde aussortiert wurden (Drexler & Uphoff, 2002). Ganz vermeiden oder ausschließen lassen sich diese primären Kontaminationen jedoch nicht.

Tabelle 1.2: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse drei verschiedener Studien zum Vorkommen und der Häufigkeit von *Mollicutes* in Zellkulturen.

Mollicutes Spezies	**Kazeminha et al., 2009, im Iran**	**Timenetsky et al., 2006, in Brasilien**	**Drexler & Uphoff, 2002, in Deutschland**
M. hyorhinis	42,5 %	63,0 %	10,0 – 40,0 %
M. fermentans	37,5 %	14,3 %	10,0 – 20,0 %
M. arginini	37,5 %	59,2 %	20,0 – 30,0 %
M. orale	12,5 %	11,2 %	20,0 – 40,0 %
A. laidlawii	7,5 %	20,4 %	5,0 – 20,0%
M. hominis	-	-	10,0 – 20,0 %
*M. salivarium**	-	8,2 %	-
% der kontaminierten Kulturen insg.	20,0 %	30,9 %	23,0 %

* *M. salivarium* wurde in der Studie von Timenetsky et al. nur zusammen mit anderen *Mollicutes* gefunden und nie als alleinige Kontamination.

In dem Glauben, solche Kontaminationsquellen zu umgehen, wurden an vielen Stellen tierische Produkte durch pflanzliche, z. B. durch Sojapepton, ersetzt. Verschiedene Studien und Fallbeispiele haben jedoch gezeigt, dass *Mollicutes* auch unter solchen Bedingungen eingeschleppt werden. So sind mindestens drei Fälle aus der pharmazeutischen Industrie bekannt in denen *A. laidlawii* aus pflanzlichen Peptonen bei Probeläufen der Fermenter mit reinem Medium (Media Fills) zu Unsterilitäten in Produktionsanlagen führte (Geigert, 2005). Während die *Acholeplasma*-Arten vor allem über die Oberfläche der Pflanzen verbreitet werden, kommen die Gattungen *Spiroplasma* und *Phytoplasma* auch im Gewebe der Pflanzen vor und vermehren sich dort. Während *Phytoplasma*-Arten bisher nicht kultiviert werden konnten, spielen die *Spiroplasma*-Arten, durch den zunehmenden Einsatz pflanzlicher Zellkulturen in Industrie und Forschung, durchaus eine Rolle (Gasparich, 2010).

Für die Verbreitung einer Kontamination sind maßgeblich der Operator und die Handhabung der Materialien und Kulturen verantwortlich. Die *Mollicutes*-Konzentration in kontaminierten Zellkulturen kann bis zu 10^6 Zellen/ml betragen (Debrazhynetskaya, et al., 2011; Drexler & Uphoff, 2002). Durch unvorsichtige Handhabung kann es leicht zu einer Übertragung kommen. Zudem können einige *Mollicutes* in flüssigen Medien und Kulturen sowie sogar getrocknet auf Oberflächen sehr lange überleben (Drexler & Uphoff, 2002; Nagatomo, et al., 2001; Windsor, et al., 2010; Taylor-Robinson & Behnke, 1987). Auf die Verbreitung der *Mollicutes* durch den Operator deutet z. B. die Beobachtung hin, dass es sich bei den innerhalb eines Labors auftretenden Kontaminationen in verschiedenen Zellkulturen häufig um dieselben Spezies handelt (Drexler & Uphoff, 2002). Auch das Auftreten mehrfach kontaminierter Kulturen spricht für diese Ursache, ebenso wie die Beobachtung, dass *M. salivarium*, ein häufigen Bewohner der oralen Flora des Menschen, fast ausschließlich in Kombination mit anderen *Mollicutes* vorkommt (siehe Tabelle 1.2). Durch den Austausch der Zellkulturen zwischen verschiedenen Laboren, vor allem in der Forschung, werden die *Mollicutes* zusätzlich verbreitet.

Die Auswirkungen von *Mollicutes*-Kontaminationen auf die betreffende Zellkultur können sehr unterschiedlich sein. Häufig kommt es zur Konkurrenz um Nährstoffe und biosynthetische Bausteine wie z. B. Aminosäuren und Nukleinsäuren. Nicht-fermentative *Mollicutes* nutzen den Arginin-Hydrolase-Weg zur ATP-Synthese und führen so schnell zu einem Arginin-Mangel in der Zellkultur. Die Auswirkungen auf die Zellen reichen von Wachstumsstörungen bis hin zu Veränderungen des Genoms. Letzteres ist vermutlich auf die Inhibition der Histonsynthese zurück zu führen, da diese DNA-stabilisierenden Proteine sehr reich an Arginin sind. Chromosomenbrüche, Translokationen und Reduzierung der Chromosomenanzahl können daraufhin die Folgen sein (Rottem & Naot, 1998; Razin & Freundt, 1984).

Die Adhäsion der *Mollicutes* an die eukaryotischen Zellen kann weiterhin einen starken Einfluss auf Rezeptoren und Transportmechanismen haben. So können zerstörte Ionen-Kanäle (K^+-Kanäle) zur Depolarisierung der Membran führen. Die membrangebundenen Phospholipasen, die viele der *Mollicutes* aufweisen, können die Phospholipide der Wirtzellmembran hydrolysieren und so die Zerstörung der Zellmembran zur Folge haben. Toxische Stoffwechselprodukte wie z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) können oxidativen Stress auslösen und so ebenfalls zur Zerstörung der Membran führen (Rottem & Naot, 1998).

Mollicutes verursachen in der Regel keine sichtbare Trübung der Flüssigkulturen oder Medien. Nur selten kommt es zu einer Veränderung des pH-Wertes, was durch den Farbumschlag des Indikators im Wachstumsmedium zu erkennen wäre. Demzufolge sind solche Kontaminationen nur schwer ohne spezifische Tests zu erkennen und bleiben häufig unentdeckt.

Die nachhaltigste Lösung, um eine *Mollicutes*-Kontamination zu beseitigen, ist das Vernichten der betroffenen Kultur und eine gründliche Reinigung und Desinfektion aller Geräte, einschließlich der Brutschränke und Werkbänke. Wenn die Zellkulturen zu wertvoll sind, um sie zu vernichten, gibt es nur die Möglichkeit die Kultur mit Antibiotika zu behandeln (siehe Kapitel 1.1). In vielen Studien wurde die

Wirksamkeit verschiedener Antibiotika für diesen Zweck untersucht (Drexler & Uphoff, 2002; Kazemiha, et al., 2009). Im optimalen Fall sollten die *Mollicutes* nachhaltig und ohne Schäden der Zellkultur beseitigt werden. Tatsächlich gab es aber kein Antibiotikum, das diese Erwartungen erfüllte. In vielen Fällen wuchsen nach einigen Monaten erneut *Mollicutes* in den Kulturen. Zudem kam es auch immer wieder zum Verlust der Zellen durch die zytotoxischen Effekte der Antibiotika.

Für die industrielle Verwendung Zellkultur-basierter Herstellungsprozesse bedeuten *Mollicutes*-Kontaminationen massive Einbußen. Negative Auswirkungen auf die Ausbeute, Reinheit und Wirksamkeit der Produkte sind nicht auszuschließen, so dass eine gleichbleibend, gute Qualität nicht mehr gewährleistet werden kann. Auch besteht je nach Produkt das Risiko die Patienten mit *Mollicutes* zu infizieren. Im Fall von viralen Impfstoffen sind die Maßnahmen zur Virusinaktivierung meist ausreichend, um lebende *Mollicutes* abzutöten (Volokhov, et al., 2010). Dennoch können Nebenprodukte während der Fermentation entstehen, die, wenn sie in das fertige Produkt gelangen, noch immer ein Risiko für den Patienten darstellen und/ oder die Qualität des Produkts beeinflussen. Auf Grund dessen ist die Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* bei der Herstellung aller Zellkultur-basierten, pharmazeutischen Produkte von den Behörden weltweit vorgeschrieben.

1.3 Regulatorische Vorgaben für Impfstoffhersteller

Die Herstellung pharmazeutischer Produkte ist zum Schutz der Patienten stark reglementiert. Diese Reglementierung beruht auf den GMP-Grundsätzen (GMP = Good Manufacturing Practice, dt. Gute Herstellungspraxis), deren Kernpunkte die Sicherung der Qualität von Herstellungs- und Qualitätskontrollprozessen darstellen (Bundesministerium der Justiz, 2006).

In Deutschland ist das Arzneimittelgesetzt (AMG) die Grundlage für die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV). Diese wiederum ist der Leitfaden für alle Unternehmen, die in Deutschland pharmazeutische Produkte oder Medikamente herstellen und/oder vermarkten wollen. Darin ist unter anderem die Herstellung, Lagerung und der Transport sowie Sicherung und Kontrolle der Qualität von Arzneimitteln und ihrer Zulassung und Registrierung geregelt (BfArM, 2011).

Diese nationalen Regularien sind den Europäischen untergeordnet. Die „European Medicines Agency“ (EMA) gehört zur europäischen Union und ist innerhalb der EU für die Beurteilung und Überwachung von Arzneimitteln zuständig. Ihr Ziel ist die Harmonisierung der nationalen Gesetze und Verordnungen aller Mitgliedsstaaten (EMA, 2011). Das „Europäische Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln“ ist Herausgeber der Europäischen Pharmakopöe (E.P.), auch europäisches Arzneibuch genannt (EDQM, 2011). Sie ist auf europäischer Ebene das Äquivalent zum deutschen AMWHV.

In den USA stellt der „Code of Federal Regulations“ (CFR) die gesetzliche Grundlage für die U.S. Pharmacopoeia (USP) dar. Herausgeber der USP ist die „Food and Drug Administration” (FDA) (U.S.

Department of Health and Human Services, 2011). Zusätzlich zur USP verfassen einzelne Abteilungen der FDA themenspezifische Leitfäden. So verfasst z. B. das „Center for Biological Evaluation and Research" (CBER) die „Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases" als Leitfaden für Impfstoffhersteller (CBER, 2010).

Für die vorliegende Arbeit sind die Vorgaben der E.P. (7th Edition; Chapter 2.6.7. – Mycoplasmas) und der USP (34 Edition, Chapter 63 – Mycoplasma Test) zur Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* bei der Herstellung von viralen Impfstoffen unter Verwendung von Zellkulturen maßgebend. Demzufolge müssen alle Saatviren, Saatzellen („Master- and Working Seeds") und Kontrollzellen sowohl mit der Indikatorzell-Methode, als auch mit der Kultivierungsmethode getestet werden. Bei Virusernten, Impfstoff-Rohware und Endprodukten muss dagegen nur die Kultivierungsmethode angewendet werden. Beide Methoden sind im Detail in den Arzneibüchern beschrieben und beruhen auf der Kultivierung der Proben in Zellkulturen (Indikatorzell-Test) oder in künstlich hergestellten, komplexen Nähmedien (Kultivierungstest). Die Testdauer beträgt 10 Tage, bzw. 28 Tage. Zum Zeitpunkt der Einführung dieser klassischen Testmethoden für *Mollicutes* entsprachen sie dem Stand der Technik. Zudem waren alternative, molekularbiologische Methoden weitgehend unbekannt bzw. nicht ausreichend etabliert (PDA, 2010).

Seit 2006/ 2007 sind neben den klassischen Methoden auch sogenannte PCR-basierte Schnellmethoden von den Europäischen und den US-Amerikanischen Behörden zur Detektion von *Mollicutes* zugelassen und in den Arzneibüchern (E.P. und USP) beschrieben. Die Testergebnisse PCR-basierter Methoden können theoretisch bereits nach 1 – 2 Tagen zur Verfügung stehen. Grund für die Aufnahme dieser Methoden in die Arzneibücher ist vor allem die Weiterentwicklung der biologischen Produkte, die oftmals nur sehr kurze Haltbarkeitszeiten haben und bei denen die langwierigen, klassischen Tests daher nicht anwendbar sind. Auch für Kontrollen während des Herstellungsprozesses sind die bisherigen Methoden unpraktisch, da die Verfahren häufig nicht unterbrochen werden können, bis nach 28 Tagen ein Ergebnis des Kultivierungstests vorliegt (Volokhov, et al., 2011). Zudem sind beide Methoden nicht geeignet, um im Fall einer Kontamination der Produktionsanlagen eine schnelle Ursachenanalyse und Beseitigung durchzuführen. Im Fall eines saisonalen Produktes, wie z. B. der Grippe-Impfstoffe, würde eine *Mollicutes*-Kontamination den Ausfall einer kompletten Saison bedeuten. Dies hätte nicht nur einen wirtschaftlichen Schaden für den Hersteller zu Folge, sondern unter Umständen auch einen Versorgungsengpass für die Patienten. Zudem kann durch die Etablierung von Schnellmethoden im Fall von Pandemien, wie sie zuletzt 2009 durch den H1N1 Grippe-Erreger ausgelöst wurde, die Reaktionszeit erheblich verkürzt werden, bis geeignete Therapien zur Verfügung stehen. Um neue Therapiemöglichkeiten für den klinischen Bereich ohne ein erhöhtes Risiko einer *Mollicutes*-Verunreinigung zugänglich zu machen und um die Qualität der Produkte und die zuverlässige Versorgung der Patienten zu gewährleisten, liegt die Etablierung schneller Methoden ohne Qualitätseinbußen sowohl im Interesse der Pharmaindustrie, als auch der Behörden, stellvertretend für die Patienten.

1.4 Vergleich der klassischen und PCR-basierten Methoden zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes*

Für den Kultivierungstest gemäß E.P. 7.2 werden zwei verschiedene Wachstumsmedien für *Mollicutes* eingesetzt. Auf jeweils einer Agarplatte der beiden Medien werden 0,2 ml der Proben ausgestrichen und kultiviert. Zusätzlich werden jeweils 100 ml von jedem Medium in Flüssigkultur mit 10 ml der zu untersuchenden Probe inokuliert. Diese Flüssigkulturen werden für 21 Tage bei 35 °C bis 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit werden nach 3, 7, 14 und 21 Tagen Subkulturen auf Agarplatten der zwei zuvor eingesetzten Medien angelegt und erneut 14 Tage inkubiert. Lediglich die Subkulturen von Tag 21 werden nur 7 Tage inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt die Kontrolle auf *Mollicutes*-Kolonien auf den Agarplatten. Insgesamt dauert dieser Test 28 Tage. Es ist viel Erfahrung notwendig, um die manuelle, optische Auswertung zuverlässig durchführen zu können. Mit diesem Verfahren können ausschließlich *Mollicutes* nachgewiesen werden, die auf den künstlichen Medien wachsen. Es ist bekannt, dass diese Fähigkeit selbst für verschiedene Subtypen einer Spezies nicht immer gegeben ist (Razin & Freundt, 1984). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt etwa zwischen 1 und 10 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml bei einem Probenvolumen von 10 ml.

Der Indikatorzelltest beginnt mit der 3-tägigen Anzucht einer geeigneten Zellkultur, z. B. Vero-Zellen oder MDCK-Zellen. Die Zellkultur wird mit 1 ml der zu testenden Probe inokuliert und mindesten drei Tage inkubiert, bevor die Zellen auf einem „cover slip“ (Objektträger mit einer Vertiefung) subkultiviert werden. Auf diesem werden sie nach drei weiteren Tagen fixiert und die DNA der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. *Mollicutes* werden bei dieser Methode als kleine, leuchtende Punkte auf oder in den Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops optisch detektiert. Der Test dauert insgesamt ca. 10 Tage und auch hier ist sehr viel Erfahrung nötig, um die manuelle Auswertung zuverlässig durchführen zu können. Die Bandbreite der nachzuweisenden *Mollicutes* ist hier größer, als bei der Kultivierungsmethode, da durch den Einsatz von Zellkulturen die Wachstumsbedingungen (z. B. Nährstoffversorgung) für mehr *Mollicutes*-Spezies geeignet sind. Die Nachweisgrenze liegt jedoch nur bei ca. 100 KBE/ml bei einem Probenvolumen von nur 1 ml.

Der Hauptunterschied zwischen den klassischen und PCR-basierten Methoden ist, dass für molekularbiologische Methoden keine Kultivierung der *Mollicutes* nötig ist, sondern die DNA direkt nachgewiesen werden kann. Dadurch wird die Testdauer im optimalen Fall auf 1 bis 2 Tage verkürzt. Die Bandbreite der zu detektierenden Spezies ist vor allem von der Sequenz der Primer abhängig, mit denen in der PCR die *Mollicutes*-DNA amplifiziert wird. Durch den Einsatz von 16S rDNA-Primern können theoretisch alle *Mollicutes* detektiert werden. Für molekularbiologische Methoden gibt es heute bereits eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Automatisierung der Probenbearbeitung. Dadurch ist die Qualität des Tests nicht mehr in dem Maße von erfahrenen Operatoren abhängig, wie dies bei den klassischen Methoden der Fall ist. Die Nachweisgrenze von PCR-basierten Tests hängt von der DNA-Extraktionsmethode ab. Es gibt

dabei verschiedene Möglichkeiten, z. B. das Ausfällen der DNA aus einem Lysat, die Extraktion über magnetische Partikel, die an DNA binden und dann über Magneten separiert werden, oder Bindung der DNA an Filter-Säulchen, auf denen sie von den restlichen Bestandteilen der Probe frei gewaschen wird. Als zweiten Parameter für erhöhte Sensitivität, vor allem aber auch höhere Spezifität des Nachweises gibt es verschiedene, weiterentwickelte PCR-Methoden wie „Touch-down"-PCR und „Nested"-PCR. Die einfachste Möglichkeit, die Sensitivität eines Tests zu beeinflussen, ist jedoch das verwendete Probenvolumen. Je größer das Probenvolumen, umso sensitiver der Nachweis. Allerdings gilt es bei großen Probenvolumen sicherzustellen, dass es nicht zu Inhibitionen der PCR durch die Probenmatrix kommt. Der Vorteil der PCR-basierten Methoden im Vergleich zu den Klassischen liegt also in der deutlich verkürzten Testzeit und der größeren Bandbreite der detektierbaren Spezies ohne einen Verlust der Sensitivität.

1.5 Anforderungen an eine PCR-basierte Methode zur Detektion von *Mollicutes* für die Chargenfreigabe von Impfstoffen

Die Zulassung eines Produktes umfasst nicht nur das Produkt selber, sondern indirekt auch seine Herstellung, die eingesetzten Rohstoffe, den Transport, die Lagerung und auch die Qualitätskontrolle. Dem entsprechend ist die Voraussetzung für den Einsatz eines neuen Verfahrens für die Kontrolle der Qualität eines oder mehrerer bereits zugelassener Produkte, dass diese Methode ebenfalls durch die Behörden zugelassen wird. Dafür muss der Hersteller nachweisen, dass der Einsatz der neuen Methode keine negativen Auswirkungen auf die Beurteilung der Qualität des Produkts zur Folge hat. Um diesen Nachweis zu erbringen, muss die Methode validiert werden. Durch die Validierung wird nachgewiesen und dokumentiert, dass das Verfahren mit angemessen großer Sicherheit reproduzierbare Ergebnisse liefert. Diese müssen den zuvor festgelegten oder vorgegebenen Kriterien und deren Spezifikationen entsprechen.

Bei etablierten und bereits implementierten Verfahren sind diese Vorgaben in der Regel bereits vorhanden. So ist z.B. die Durchführung der offiziellen Methoden zur Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* genau in den Arzneibüchern beschrieben. Für neue oder geänderte Produkte beschränkt sich die Validierung eines solchen, bekannten Tests auf den Nachweis, dass keine matrixbedingten Inhibitionen der Methode auftreten. Der Umfang einer solchen Validierung ist in der Regel sehr viel geringer als die Validierung neuer Methode für bereits etablierte Produkte oder Probenmatrizen. Die Schwierigkeit bei der Validierung einer neuen Methode liegt darin, die richtigen Kriterien zu finden und für diese Kriterien angemessene Spezifikationen (d. h. Grenzwerte) festzulegen. Für diesen Zweck werden neue Methoden zunächst evaluiert. Während der Evaluierung werden die Grenzen der Methode ausgetestet, um den Bereich definieren zu können, in dem das Verfahren zuverlässig und reproduzierbar funktioniert. Dieser entspricht den Bedingungen, unter denen später auch der Routinetest ablaufen soll.

Als einziges Arzneibuch beschreibt die E.P. 7.2 die Anforderungen an die Validierung einer PCR-basierten Methode zum Nachweis auf Abwesenheit von *Mollicutes*. Diese umfassen den Nachweis der Spezifität, der

Robustheit und der Sensitivität. Zusätzlich muss die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der neuen Methode mit denen der bisherigen, offiziellen Methoden gezeigt werden. Seit 2011 ermöglicht auch die USP die Anwendung von PCR-basierten Methoden. Die einzigen Voraussetzungen dafür sind, dass die Methode validiert und mit den bisherigen Verfahren vergleichbar ist. Genauere Informationen zur Umsetzung dieser beiden Kriterien werden in der USP nicht angegeben. Im Folgenden werden die Anforderungen der E.P. 7.2 an eine PCR-basierte Methode zur Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* und ihre Validierung im Detail beschrieben (EDQM, 2011).

1. Für die Validierung müssen geeignete Referenzstandards verwendet werden. Diese können aus lebenden *Mollicutes* oder aus ihrer DNA bestehen.
2. Geeignete Kontrollen müssen etabliert sein: eine interne Kontrolle (gemäß E.P.) sollte zu jeder Probe gegeben werden und dient dem Nachweis auf Abwesenheit von Inhibitionen. Dabei handelt es sich z.B. um eine DNA-Sequenz, die die Primer-Bindestellen der PCR-Reaktion trägt. Das Amplifikat der Kontrolle soll sich aber bei der Detektion deutlich von dem Amplifikat der *Mollicutes* unterscheiden. Um alle Arbeitsschritte abzudecken, sollte diese Kontrolle bereits vor der DNA-Extraktion zu der Probe gegeben werden. Die externe Kontrolle soll gemäß E.P. aus einer definierten Menge der Zielsequenz bestehen, deren Konzentration nahe der Nachweisgrenze liegt. Dadurch soll nachgewiesen werden, dass die erwartete Sensitivität des Tests erreicht wurde und es während der Testdurchführung zu keinen Verlusten des Zielmoleküls kam.
3. Die Ergebnisse des Tests müssen interpretierbar sein. Das heißt, im Falle eines positiven Ergebnisses müssen *Mollicutes* als Ursache bestätigt bzw. ausgeschlossen werden können, um so falsch-positive Testergebnisse zu erkennen.
4. Der spezifische Nachweis von *Mollicutes* muss gezeigt werden. Kreuzreaktionen, z. B. mit anderen Bakterien, müssen in der Validierung dokumentiert werden. Sollten Unspezifitäten auftreten, muss, wie in Punkt 3 beschrieben, ein Verfahren etabliert werden, mit dem die Interpretation der Ergebnisse gewährleistet werden kann.
5. Die Nachweisgrenze der Methode muss für alle *Mollicutes*-Arten, die als Referenzstandards in der Validierung zum Einsatz kommen, gezeigt werden. Dazu wird der sogenannte „positive cut-off point“ bestimmt. Dabei handelt es sich um die Konzentration einer 10fach-Verdünnungsreihe des Zielmoleküls, die in 95 % aller Tests positiv nachgewiesen wird. Um die 95 %-Nachweisgrenze statistisch mit ausreichender Sicherheit bestimmen zu können, müssen mindestens drei unabhängige 10fach-Verdünnungsreihen von jedem Referenzstandard angelegt werden. Dabei muss die Testung mit jeder Verdünnung ausreichend oft wiederholt werden, so dass mindestens 24 Ergebnisse pro *Mollicutes*-Stamm und Verdünnung vorliegen.
6. Die Robustheit einer Methode beschreibt die Anfälligkeit einer Methode für kleinere Veränderungen in der Durchführung eines Verfahrens und die möglichen Auswirkungen auf die Ergebnisse des Tests. Damit sind z.B. unterschiede in den Konzentrationen der Reagenzien, Inkubationsbedingungen,

verschiedene Gerätetypen und Operatoren gemeint. Die Robustheit der Methode muss in der Validierung gezeigt werden.

7. Die Vergleichbarkeit der PCR-basierten Methode und ihrer Ergebnisse mit denen der offiziellen Methoden muss gewährleistet sein. Diese Vergleichbarkeit bezieht sich laut E.P. vor allem auf die Nachweisgrenze. Um den Indikatorzelltest zu ersetzten, muss diese ≤ 100 KBE/ml sein, für den Kultivierungstest ≤ 10 KBE/ml. Um die Nachweisgrenze der Methoden vergleichen zu können, müssen geeignete Referenzstandards eingesetzt werden, deren Anzahl der Genkopien und der KBE pro Milliliter bekannt sind.

Verschiedene Hersteller, darunter Roche, Life Technologies, Millipore/Merck und Greiner Bio-One bieten sogenannte „Ready to use-Kits“ für die Detektion von *Mollicutes* an. Diese unterscheiden sich maßgeblich in dem zugrunde liegenden Prinzip, sowohl in Bezug auf die DNA-Extraktion, als auch auf das PCR-System und die folgende Detektion der PCR-Produkte. Bei allen handelt es sich aber um vom Hersteller validierte Methoden, die gemäß deren Angaben die Anforderungen der E.P. vor allem in Bezug auf die Sensitivität erfüllen.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte eine PCR-basierte Methode zum Nachweis von *Mollicutes* in der Qualitätskontrolle, Bereich Mikrobiologie und Sterilitätssicherheit, der Firma Novartis Vaccines & Diagnostics (NVD) in Marburg etabliert werden.

Ziel war es, die Grundlagen für die Validierung und Zulassung dieser Methode durch die Behörden zu schaffen, sodass die klassischen Testmethoden zur Chargenfreigabe in der Routine durch das neue Verfahren ersetzt werden können. Dabei sollten alle Vorgaben der Behörden sowie Fragen und Risiken von Seiten NVD berücksichtigt werden. Kernpunkte dieser Arbeit waren:

- Die Auswahl einer geeigneten Methode für die Detektion von Mollicutes in verschiedenen Produkten/Produktstufen und für die Prüfung der Abwesenheit von Mollicutes zur Chargenfreigabe.
- Die Etablierung und Charakterisierung geeigneter Mollicutes Referenzstandards für die Validierung einer PCR-basierten Methode.
- Die Evaluierung der geeigneten Methode zur Festlegung der Spezifikationen für die Validierungsparameter.
- Der Nachweis der Vergleichbarkeit des neuen, PCR-basierten Schnelltests mit den klassischen Testverfahren.
- Die Bewertung der Testsicherheit durch die Betrachtung von a) dem Risiko für falsch-negative Testergebnisse und b) dem Risiko für falsch-positive Testergebnisse durch Kontaminationen während der Testdurchführung und auf Grund von freier DNA aus bereits abgestorbenen Zellen, ohne dass eine lebende Kontamination der Fermentationsanlagen und Produkte vorliegt.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Steriles Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurden steril verpackt vom Hersteller bezogen. Alle Materialen, die bei DNA-Extraktionen und PCR-Reaktionen verwendet wurden, waren zudem frei von DNasen und RNasen, sowie pyrogenfrei. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Materialien von den Herstellern Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Life Technologies (Darmstadt) und VWR (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren, bis auf wenige Ausnahmen, Bestandteile der „ready to use“-Kits, die zum Einsatz kamen (siehe Tabelle 2.1). Zusätzlich verwendet wurden die HotStar Taq Polymerase (5 U/µl) von Qiagen (Hilden), die Uracil-DNA-Glykosylase (1 U/µl) von Invitrogen (Schwerte), PCR-Wasser (DNase/RNase-frei) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Ethanol (97 %) von Merck (Darmstadt), Hi-Di™ Formamide von Life Technologies (Darmstadt) und Stereox-Puffer (NaCl-Pepton-Puffer) der Firma Heipha Dr. Müller GmbH (Eppelheim).

Tabelle 2.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten „ready to use“ Kits und ihrer Hersteller.

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
DNA Extraction Kit from Tissue	Macherey-Nagel (Düren)
CytoInspect™ *Mycoplasma* DNA Extraction Kit	Greine Bio-One (Frickenhausen)
CytoInspect™ *Mycoplasma* Detection Kit	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
MycoTOOL™ PCR *Mycoplasma* Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg)
PrepSEQ™ *Mycoplasma* Nucleic Acid Extraction Kit	Life Technologies (Darmstadt)
MycoSEQ™ *Mycoplasma* Real-Time PCR Detection Kit	Life Technologies (Darmstadt)
Fast MicroSEQ™ 500 16S rDNA PCR Kit	Life Technologies (Darmstadt)
MicroSEQ™ 500 16S rDNA Sequencing Kit	Life Technologies/ (Darmstadt)
ExoSap™-IT	USB Europe GmbH (Staufen im Breisgau)

2.1.3 Nährmedien

Für die Kultivierung der *Mollicutes* wurde ausschließlich Friis und Frey Medium gemäß E.P. der Firma Heipha Dr. Müller GmbH (Eppelheim, Deutschland) verwendet. Diese wurden sowohl als Bouillon, als auch in Form von Agarplatten eingesetzt. Für alle anderen Bakterien wurde Schafblutagar, ebenfalls von der Firma Heipha Dr. Müller GmbH, eingesetzt. Sojapepton-Caseinpepton Medium und Thioglykolat Medium wurden von der Fa. bioMérieux (Nürtingen, Deutschland) bezogen

2.2 Geräte

Alle Geräte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Zentrifugationsgeschwindigkeiten der Multifuge X1R der Fa. Thermo Scientific werden in dieser Arbeit als Vielfaches der Erdbeschleunigung (g) angegeben, die Zentrifugationsgeschwindigkeiten der Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf dagegen in rpm.

Tabelle 2.2: Auflistung aller Geräte, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Gerätebezeichnung	**Hersteller**
Laminar Flow HERAsafe KS	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Inkubator (+35 bis +38 °C)	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Tiefkühlschrank (-60 bis -99°C)	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Tiefkühlschrank (- 15 bis 25°C)	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Kühlschrank (+2 bis +8 °C und +4 bis +12 °C)	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge X1R	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Homogenisator Precellys 24	Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
PCR Cycler GeneAmp PCR System 9700	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
CheckScanner	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
3130xl Genetic Analyser	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Geldokumentationsanlage	Intas (Göttingen, Deutschland)
Binokular MZ16 A	Leica (Wetzlar, Deutschland)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.3 Probenmaterial

Bei allen Proben, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, handelt es sich ausschließlich um Material aus technischen Läufen der Zellkultur- und Eibasierten Produktionsanlagen (z. B. Wartungs- oder Entwicklungsläufe), die nicht zur Herstellung von kommerziell gebräuchlichen Produktchargen durchgeführt wurden.

2.3.1 Material aus der Rabies-Impfstoffproduktion

Bei der Rabies-Virusernte handelt es sich um den Überstand einer primären, adhärenten Zellkultur, die aus Hühnerembryonen hergestellt und mit dem konjugierten Tollwut-Erreger infiziert wurde. Die Probenahme erfolgte am Ende der Virusanzucht (sog. up stream) vor den Arbeitsschritten zur Reinigung und Abfüllung (sog. down stream) des Impfstoffes.

2.3.2 Material aus der Grippe-Impfstoffproduktion

Bei der „Flu Cell Culture“ FCC-Virusernte handelt es sich um eine kontinuierliche MDCK-Zellkultur (Madin Darby Canine Kidney), die mit Grippeviren infiziert wurde. Im Gegensatz zu der Rabies-Virusernte sind diese besonderen MDCK-Zellen nicht adhärent, sondern wachsen in Suspension. Dem entsprechend bestehen diese Proben nicht nur aus dem Überstand, sondern aus der kompletten Zellkultur, inklusive der eukaryotischen Zellen und Viren. Die synthetischen Medien, die bei diesem Prozess zum Einsatz kommen, enthalten keine tierischen Rohstoffe, wie z. B. Seren. Die Probenahme erfolgt auch hier am Ende der Virusanzucht vor der Reinigung und Abfüllung des Impfstoffes. Diese Matrix stellt für PCR-basierte Methoden die „worst-case matrix“ dar, da hier die DNA der *Mollicutes* aus einer großen Menge eukaryotischer Zellen und ihrer DNA isoliert und detektiert werden muss.

„Flu egg-based“ ist ebenfalls eine Grippevirusernte. Diese besteht aus der Allantoisflüssigkeit von Hühnereiern, die mit Grippeviren infiziert und bebrütet wurden.

2.3.3 Rohmaterialien

FKS (Fötales Kälberserum) ist ein Rohstoff, der bei der Herstellung von Wachstumsmedien für die verschiedensten Zellkulturen zum Einsatz kommt.

NaCl-Pepton Puffer (Stereox-Puffer) (siehe Kapitel 2.1.2) wird in der Qualitätskontrolle bei der Durchführung verschiedenster Testungen, z. B. zum Anlegen von Verdünnungsreihen verwendet.

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 Verwendete *Mollicutes*-Spezies und die Herstellung der Zellsuspensionen

In dieser Arbeit wurden insgesamt zehn verschiedene *Mollicutes*-Spezies eingesetzt (siehe Tabelle 2.3). Von jeder dieser Spezies wurden Zellsuspensionen hergestellt und als Referenzstandards für NVD Marburg charakterisiert (siehe Kapitel 3.2). Acht der Zellsuspensionen wurden von MicroSafe Laboratories Laboratories (Leiden, Niederlande) hergestellt. Die übrigen Drei (von *M. pneumoniae* wurde eine zweite Zellsuspension hergestellt) wurden von der Fa. Mycosafe (Wien, Österreich) hergestellt. In Tabelle 2.3 sind alle elf Referenzstandards und ihre Hersteller aufgelistet.

Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit vorkommenden *Mollicutes*-Spezies und dem jeweiligen Hersteller der Zellsuspension.

***Mollicutes*-Spezies**	**ATCC/ NCTC Nr.**	**Firma**
Acholeplasma laidlawii	ATCC 23206	MicroSafe Laboratories (Leiden, Niederlande)
Mycoplasma gallisepticum	ATCC 19610	
Mycoplasma hyorhinis	ATCC 17981	
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 15531	
Mycoplasma arginini	ATCC 23838	
Mycoplasma fermentans	ATCC 19989	
Mycoplasma synoviae	ATCC 25204	
Mycoplasma orale	ATCC 23714	
Mycoplasma pneumoniae FH^T	NCTC 10119	Mycosafe Diagnostics GmbH (Wien, Österreich)
Mycoplasma hominis $PG21^T$	NCTC 10111	
Mycoplasma salivarium $PG20^T$	NCTC 10113	

Von jeder der elf Zellsuspensionen wurden 500 Aliquots zu je 1 ml Volumen aus einer Charge abgefüllt. Folgende Bedingungen mussten bei der Produktion der Zellsuspensionen eingehalten und dokumentiert werden:

- Die Ernte der Zellen musste in der exponentiellen Wachstumsphase stattfinden. Zuvor musste für jede der zehn Spezies eine eigene Wachstumskurve gemessen werden, um den optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln.
- Die Lebendzellzahl (Titer in KBE/ml) der *Mollicutes* Zellsuspensionen musste vor Einfrieren und nach Einfrieren (Lebendzellzahl) der Aliquots bestimmt werden.
- Die Wachstumsmedien, die bei den Herstellern verwendet wurden, unterschieden sich von denen, die bei NVD in Marburg zur Kultivierung verwendet wurden. Daher mussten alle

Titerbestimmungen bei den Herstellern der Zellsuspensionen mit deren eigenen (internen) Medien, als auch mit den bei Novartis eingesetzten Heipha-Medien durchgeführt werden.

- Im Rahmen der Qualitätskontrolle beim Hersteller musste die Identität der *Mollicutes*-Spezies bestätigt und die Reinheit (Abwesenheit von fremden Organismen/Kontaminationen) der Zellsuspensionen gezeigt werden.
- Die Aliquots wurden bei den Herstellern bei < -60° C gelagert und auf Trockeneis geliefert. Bei NVD in Marburg wurden die Aliquots in der Gasphase vom flüssigem Stickstoff bis zu Verwendung gelagert.
- Im Rahmen der Wareneingangskontrolle im mikrobiologischen Labor der Qualitätskontrolle bei NVD in Marburg wurde die Reproduzierbarkeit des Titers (Lebenzellzahl), die Reinheit und die Identität der Zellsuspensionen überprüft (siehe Kapitel 2.5.3 und 2.6.2).

2.4.2 Weitere Bakterienarten, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden

Neben den *Mollicutes* wurden in dieser Arbeit zehn weitere Bakterienarten verwendet. Zur Herstellung der Kryokulturen (Zellsuspensionen) wurden die Bakterien in Sojapepton-Caseinpepton Medium (Aerobier) bzw. in Thioglykolat-Medium (Anaerobier) bei 30 °C bis 35 °C für 1 bis 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden 1:10-Verdünnungen der Kulturen mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung in der Gasphase vom flüssigen Stickstoff gelagert. Diese Zellsuspensionen durften nur bis zur 5. Passage angesetzt werden, das heißt der Master Seed darf maximal viermal passagiert worden sein. Für die ATCC-Stämme gilt dies ausgehend von der ursprünglichen, lyophilisierten Kultur der ATCC, für die Eigenisolate ausgehend von der ersten Kultur (1. Passage) des Isolats.

Tabelle 2.4: Auflistung der für die Spezifitätsanalysen eingesetzten Bakterien.

Spezies	**ATCC Nr.**
Streptococcus pyogenes	12351
Streptococcus bovis	9809
Clostridium sporogenes	11437
Lactobacillus fermentum	9338
Ralstonia picketii	Eigenisolat (LIMS ID 1967753)
Bacillus pumilus	Eigenisolat (LIMS ID 2007574)
Bacillus thuringiensis	Eigenisolat (LIMS ID 1593725)
Pseudomonas monteilii	Eigenisolat (LIMS ID 1650087)
Micrococcus luteus	Eigenisolat (LIMS ID 1394847)
Staphylococcus epidermidis	Eigenisolat (LIMS ID 1606224)

Die Lebenzellzahl aller Kryokulturen wurde nach dem Einfrieren bestimmt, indem eine 10fach-Verdünnungsreihe mit mindestens sechs Verdünnungsstufen angelegt und von jeder Verdünnung 100 µl auf eine Agarplatte des geeigneten Wachstumsmediums ausplattiert wurde. Die Zellkonzentration der Kryokulturen wurde berechnet, indem ausgehend von mindestens drei der angelegten Verdünnungsstufen der Titer (KBE/ml) der unverdünnten Kryokulturen berechnet wurde. Der Mittelwert dieser drei Konzentrationen wurde als Zellkonzentration der Kryokultur festgelegt.

Tabelle 2.4 gibt Auskunft über die neun Stämme und ihre Identität (ATCC Nr.). Für die sechs Eigenisolate wurde die LIMS-ID angegeben. Bei der LIMS-ID handelt es sich um die interne Nummer der Identitätsprüfung, die für den jeweiligen Stamm bei NVD in Marburg durchgeführt wurde und mit der LIMS Software der Fa. Labware dokumentiert wurde.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung der *Mollicutes*

Für die Kultivierung der *Mollicutes* wurden zwei verschiedene Wachstumsmedien verwendet: Friis und Frey Medium gemäß E.P. der Fa. Heipha (Eppelheim). Tabelle 2.5 gibt Auskunft über die zehn *Mollicutes*-Stämme und das jeweilige Wachstumsmedium. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 35 °C bis 38 °C. Flüssigkulturen inkubierten unter Luftabschluss, Agarplatten unter mikroaerophilen Bedingungen (5 – 10 % CO_2, 5 – 10 % O_2, 80 – 90 % Stickstoff) für 7 bis 14 Tage.

Tabelle 2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten *Mollicutes*-Stämme und das jeweils verwendete Kultivierungsmedium der Fa. Heipha.

***Mollicutes* Spezies**	**Kultivierungsmedium**
Acholeplasma laidlawii ATCC 23206	Friis (gemäß E.P.)
Mycoplasma gallisepticum ATCC 19610	
Mycoplasma hyorhinis ATCC 17981	
Mycoplasma pneumoniae ATCC 15531 & NCTC 10119	
Mycoplasma hominis PG21^T ATCC	
Mycoplasma salivarium PG20^T ATCC	
Mycoplasma arginini ATCC 23838	Frey (gemäß E.P.)
Mycoplasma fermentans ATCC 19989	
Mycoplasma synoviae ATCC 25204	
Mycoplasma orale ATCC 23714	

2.5.2 Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten

Zur Bestimmung der Konzentration der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) in einer *Mollicutes*-Kultur wurde zunächst eine 10fach-Verdünnungsreihe angelegt. War der Titer der Lösung bekannt, wurden die Verdünnungen mit 100 KBE/ml jeweils dreimal zu je 100 µl auf Agarplatten ausplattiert. War der Titer unbekannt, z. B. bei der Messung von Wachstumskurven, wurden bis zu sechs 10fach-Verdünnungen angelegt und jede zweite Verdünnung dreimal zu je 100 µl auf Agarplatten ausplattiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kolonien auf den Agarplatten unter dem Binokular gezählt. Aus den Koloniezahlen der drei kultivierten Agarplatten pro Verdünnung wurde der Mittelwert (KBE/ 100 µl) gebildet. Das 10fache dieser Koloniezahl entspricht dem Titer der ausplattierten Verdünnung (KBE/ml). Ausgehend von diesem Wert wurde die Zahl der KBE/ml in der unverdünnten *Mollicutes*-Lösung mit Hilfe des jeweiligen Verdünnungsfaktors berechnet.

2.5.3 Prüfung der Reinheit einer Kultur

Zur Prüfung der Reinheit (Abwesenheit von fremden Organismen) der *Mollicutes*-Zellsuspensionen wurden von diesen zweimal 200 µl auf Schafblutagar ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten fand bei 35 – 37 °C für 3 bis 5 Tage statt. Je eine Agarplatte inkubierte unter aeroben und eine unter anaeroben Bedingungen. Die anaerobe Atmosphäre wurde in einem dicht verschlossenen Anaerobentopf mit Hilfe von Anaerocult A (Fa. Merck, Darmstadt) gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die Kontrolle der anaeroben Atmosphäre erfolgte mittels Anaero-Teststreifen (Fa. Merck, Darmstadt). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Platten auf Anwesenheit von Kolonien überprüft. Es durften keine Organismen außer *Mollicutes* vorhanden sein.

2.5.4 Bestimmung der Wachstumskurven

Um eine Wachstumskurve der *Mollicutes* zu bestimmen, wurden 100 ml oder 800 ml Flüssigmedium mit einer frischen, bei RT aufgetauten Kryokultur inokuliert, sodass die Konzentration der *Mollicutes* zu Beginn der Inkubation ca. 100 KBE/ml betrug. Während der Inkubationszeit von mindestens 10 Tagen wurde täglich, beginnend mit Tag 0, der Titer (KBE/ml), wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, bestimmt. Zur Auswertung wurde die Konzentration in KBE/ml (Y-Achse) logarithmisch gegen die Zeit in Tagen (X-Achse) aufgetragen und so der Verlauf der Wachstumskurve grafisch dargestellt.

2.5.5 Herstellung der Bakteriensuspensionen für die Spezifitätsanalysen

Aus den bei Raumtemperatur aufgetauten Kryokulturen der Bakterien wurden fünf Schafblut Agarplatten mit jeweils 200 µl inokuliert. Die Inkubation fand gemäß den in Tabelle 2.6 angegebenen Bedingungen statt. Von den gut bewachsen Agarplatten wurden mit einer Einmal-Impföse das Material von dem Agar

abgenommen und in 1 ml sterilem NaCl-Pepton Puffer resuspendiert, sodass stark trübe Bakteriensuspensionen entstanden. Diese wurden bei -20 °C bis zur DNA-Extraktion (siehe 2.6.1) gelagert.

Tabelle 2.6: Überblick über die Inkubationsbedingungen zur Anzucht der sechs Bakterienarten, deren DNA-Extrakte bei der Spezifitätsanalyse zum Einsatz kamen.

Spezies	**Inkubationsbedingungen**		
	Temperatur	**Atmosphäre**	**Dauer**
Streptococcus pyogenes	30 – 35 °C	Aerob	2 Tage
Clostridium sporogenes	35 – 37 °C	Anaerob	3 Tage
Lactobacillus fermentum	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage
Ralstonia picketii	30 – 35 °C	Aerob	3 Tage
Bacillus pumilus	30 – 35 °C	Aerob	3 Tage
Streptococcus bovis	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage
Bacillus thuringiensis	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage
Pseudomonas monteilii	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage
Micrococcus luteus	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage
Staphylococcus epidermidis	35 – 37 °C	Aerob	3 Tage

2.5.6 Nachweis auf Abwesenheit von *Mollicutes* mittels Kultivierungstest (gemäß E.P.)

Für den Kultivierungstest gemäß E.P. wurden zweimal 0,2 ml der Proben direkt auf je eine Agarplatte der beiden Medien Friis und Frey subkultiviert. Zusätzlich wurden mit je 10 ml der Proben 100 ml Friis und Frey Flüssigmedium beimpft. Diese Flüssigkulturen wurden für 21 Tage bei 35 °C – 38 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurden an Tag 3, 7, 14 und 21 Subkulturen auf Festmedien (Agarplatten) angelegt. Dazu wurden je 200 µl aus den Kulturen entnommen und auf eine entsprechende Agarplatte (Friis oder Frey) ausgestrichen. Diese wurden für weitere 14 Tage mikroaerophil (5 – 10 % CO_2, 5 – 10 % O_2, 80 – 90 % Stickstoff) bei 35 °C – 38 °C inkubiert. Lediglich die Subkulturen von Tag 21 wurden nur für 7 Tage inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Agarplatten unter dem Binokular auf *Mollicutes*-Kolonien überprüft. Waren Kolonien zu sehen, wurde der Test als positiv bewertet, was bedeutet, dass die entsprechende Probe bei der Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* durchgefallen ist. Bei der Testung von unbekannten Proben werden in der Routine immer beide Wachstumsmedien (Friis und Frey) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kultivierungstest aber auch mit bekannten *Mollicutes* durchgeführt. In diesen Fällen wurde jeweils nur ein Medium verwendet (siehe Tabelle 2.5).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Methoden zur DNA-Präparation

CytoInspect™ DNA Extraction Kit, Fa. Greiner Bio-One

Die DNA-Extraktion im Rahmen des PCR-basierten *Mollicutes*-Nachweises von Greiner Bio-One wurde mit dem zugehörigen CytoInspect™ DNA Extraction Kit gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die fertigen DNA-Extrakte wurden bei -15 bis -25 °C für maximal 7 Tage gelagert.

Zu Beginn der Extraktion wurden die Proben bei 4.500 x g für 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde bis auf einen Rest von ca. 100 µl verworfen. Das Zellpellet wurde dann in dem verbleibenden Rest des Überstandes resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden die Detergenzien enthaltenden Puffer inklusive der RNase und Proteinase K gegeben. Der Lyse-Mix wurde für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Durch Zugabe von chaotrophen Salzen und Ethanol wurden anschließend die Bedingungen für die Bindung der Nukleinsäuren an die Silica-Membran in den Mini-Spin-Säulchen eingestellt. Grobe Zellreste wurden durch Zentrifugation abgetrennt, bevor der Überstand auf die Mini-Spin-Säulchen aufgetragen wurde. Die Nukleinsäuren wurden durch Ionenbindungen zwischen ihrer eigenen, negativen Ladung und der positiven Ladung der Silica-Membran an dieser reversibel fixiert. Störende Zell- und Pufferreste wurden in zwei Waschschritten entfernt. Abschließend wurde die DNA bei niedriger Ionen-Konzentrationen (5mM Tris/HCl) und einem pH von 8,5 eluiert.

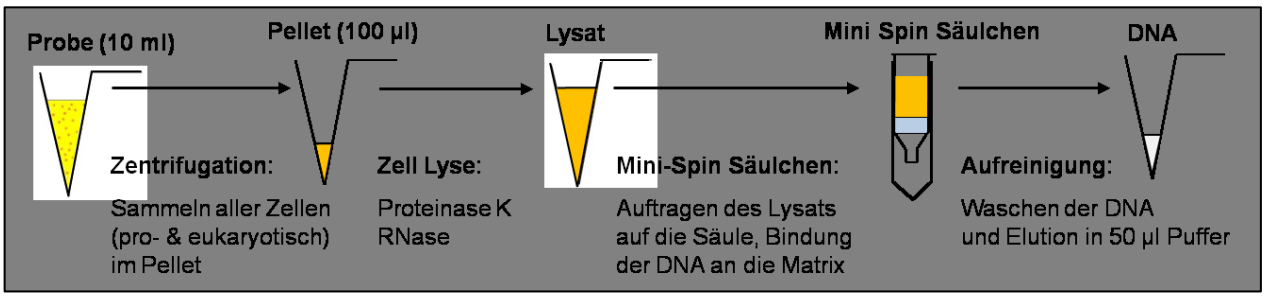


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der DNA-Extraktion mit dem CytoInspect™ DNA Extraction Kit der Fa. Greiner Bio-One. Die Probe (10 ml) wurde zu Beginn bei 4.500 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde unter Verwendung von Lyse-Puffern und Enzymen (RNase und Proteinase K) bei 56 °C lysiert. Mit Hilfe von Mini-Spin-Säulchen, die eine Silica-Membran enthalten, wurde die DNA aus dem Lysat gebunden und gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 50 µl Puffer eluiert und die fertigen DNA-Extrakte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

"Genomic DNA from Tissue Kit", Fa. Macherey-Nagel

Zur Herstellung der bakteriellen DNA-Extrakte für die Spezifitäts-Analysen und die Messung der Genomkopien der *Mollicutes*-Zellsuspensionen wurde das „Genomic DNA from Tissue Kit" der Fa. Macherey-Nagel eingesetzt. Die Protokollvorgaben des Herstellers wurden vollständig eingehalten und

die DNA-Extrakte bei -20 bis -25 °C gelagert. Das Prinzip dieser DNA-Extraktion mit Hilfe von Silicamembran Säulen entspracht dem des „CytoInspect DNA Extraction Kit“ der Fa. Greiner Bio-One (siehe vorheriger Abschnitt). Das Probenvolumen betrug hier 1 ml Bakteriensuspension, die Elution erfolgte in 50 µl Puffer.

DNA-Extraktion zur Identifizierung von Mikroorganismen mittels Sequenzierung

Um die DNA der *Mollicutes* Zellsuspensionen für die Identifizierung zu isolieren, wurden die Zellen aus jeweils 1 ml Probenvolumen durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PCR-Wasser (RNase- und DNase-frei) resuspendiert und die Zellen anschließend mit Hilfe von Glaskügelchen (Precellys-Glas-Kit 0,5 mm; 2,0 ml Tubes, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH) durch Schütteln in einem Homogenisator für 45 Sekunden bei 6.000 rpm aufgebrochen. Zelltrümmer und Glaskügelchen wurden erneut bei 14.000 rpm für 5 Minuten pelletiert und 500 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den Einsatz des DNA-Extrakts in der 16S rDNA-PCR wurde eine 1:50-Verdünnung aus 1 µl DNA-Extrakt und 49 µl PCR-Wasser (RNase- und DNase-frei) hergestellt.

2.6.2 Identifizierung von Mikroorganismen mittels Sequenzierung

Amplifikation der bakteriellen DNA

Zur Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA wurde das "Fast MicroSeq 500 16S rDNA PCR Kit" (Life Technologies) verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus 7,5 µl des verdünnten DNA-Extrakts und 7,5 µl des PCR Master Mix. Das Cycler-Programm setzte sich zusammen aus der Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden, dem Annealing der Primer bei 64 °C für 15 Sekunden und der Elongation bei 72 °C für 1 Minute. Es wurden 32 Amplifikationszyklen gefahren bevor anschließend die PCR-Produkte auf 4 °C abgekühlt wurden.

Reinigung der PCR-Produkte

Zum Reinigen der PCR-Produkte für die anschließende Sequenzierreaktion wurde das „ExoSap IT-Kit“ (USB Europe GmbH) verwendet. Dazu wurden 6,5 µl des PCR-Ansatzes mit 2,6 µl der Enzymlösung des Kits in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 15 Minuten bei 37 °C im PCR-Cycler inkubiert. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 80 °C für ebenfalls 15 Minuten, bevor der Ansatz auf 4 °C abgekühlt wurde. Das Prinzip dieser Reinigung beruhte auf dem enzymatischen Verdau einzelsträngiger DNA-Fragmente, wie Primer und unfertiger PCR-Produkte durch eine Exonuclease I und dem Abbau der übrigen dNTPs durch eine rekombinante „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (rSAP). Dies geschah während der Inkubation bei 37 °C. Die Enzyme wurden anschließend bei 80 °C wieder inaktiviert.

Ansetzen der Sequenzierreaktion

Das Prinzip der Sequenzierung funktionierte nach dem Kettenabbruch-Prinzip von Sanger. Es wurden in zwei getrennten Sequenzierreaktionen die „forward"- und die „reverse"-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde die zuvor amplifizierte 16S rDNA-Sequenz einmal vom 3´-Ende und einmal von 5´-Ende amplifiziert. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxinukleotidtriphosphate (ddNTPs) kam es bei deren Einbau zum Abbruch der Amplifikation. Da außerdem aber auch normale dNTPs eingesetzt wurden, entstanden viele verschiedene PCR-Produkte unterschiedlicher Länge. Für die Sequenzier-Reaktionen wurden jeweils 3,5 µl der gereinigten PCR-Produkte mit 6,5 µl des Sequenzier-Mix aus dem „MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing Kit" (Life Technology) gemischt. Das Cycler-Programm setzte sich zusammen aus der Denaturierung bei 96 °C für 10 Sekunden, dem Annealing der Primer bei 50 °C für 5 Sekunden und der Elongation bei 60 °C für 1,15 Minuten. Es wurden 25 Amplifikationszyklen gefahren, bevor anschließend die PCR-Produkte auf 4 °C abgekühlt wurden.

Reinigung der Sequenzierreaktionsprodukte

Die Reinigung der Sequenzierreaktionsprodukte erfolgte mit den "Sigma-Spin™ Post-Reaction Clean-Up Columns" (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Dazu wurden die Säulen gemäß den Hersteller Angaben vorbereitet. Anschließend wurden 10 µl der Sequenzierreaktionsprodukte auf die Säulen gegeben und bei 2600 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss (≥10 µl) wurde weiter für die elektrophoretische Auftrennung verwendet.

Elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierreaktionsprodukte

Mit Hilfe des Genetic Analyzer 3031xl (Life Technologies) wurden die Sequenzierreaktionsprodukte der Größe nach durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Fluoreszenz der Markermoleküle an den Enden der DNA-Fragmente unterschied sich, je nachdem welche der vier möglichen ddNTPs (Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin) als letzte eingebaut wurde. Sie wurden mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz mit einem Sensor detektiert. Auf diese Weise entstand ein Chromatogramm, das mit Hilfe der zugehörigen Software in eine Basensequenz umgewandelt werden konnte. Zur Vorbereitung der elektrophoretischen Auftrennung wurden in „96-well plates" 10 µl Formamid-Lösung ("Hi-Di™ Formamide") mit 10 µl des gereinigten Sequenzierprodukts gemischt. Anschließend wurden die Platten in den Reader eingelegt und die Messung automatisch mit der Software "3130xl Data Collection" durchgeführt. Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit Hilfe der "MicroSeq ID"-Software. Dabei wurde zunächst eine Konsensus-Sequenz aus der „forward" und der „reverse" Sequenz erstellt und diese dann mit der Sequenz-Datenbank der "MicroSeq ID"-Software verglichen. Nur wenn diese keine eindeutige Zuordnung erlaubte, wurde zusätzlich ein Datenbankabgleich mit dem NCBI BLAST Programm durchgeführt. Für eine Zuordnung auf Speziesebene musste eine Sequenzhomologie von ≥ 98 % vorliegen, für die Gattungsebene ≥ 92 %.

2.6.3 Methoden zur DNA-Quantifizierung

Photometrische DNA-Bestimmung

Zur photometrischen DNA-Bestimmung wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines kalibrierten BioPhotometers (Eppendorf) gemessen. Es wurde eine Mikroküvette verwendet. Bei der zu messenden Lösung handelte es sich maximal um eine 1:14 Verdünnung der Ausgangslösung (65 µl PCR Wasser und 5 µl DNA-Lösung). Bei zu hohen DNA-Konzentrationen wurde auch eine 1:70 Verdünnung (69 µl PCR Wasser und 1 µl DNA-Lösung) eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde in µg/ml angegeben.

Quantifizierung der DNA mittels Threshold-Methode

Zur DNA-Bestimmung mittels Threshold-Analyse wurden die Proben zur Firma CharlesRiver (NewLab) verschickt. Bei dieser Methode handelte es sich um ein biochemisches Verfahren und diente der Quantifizierung von DNA-Spuren.

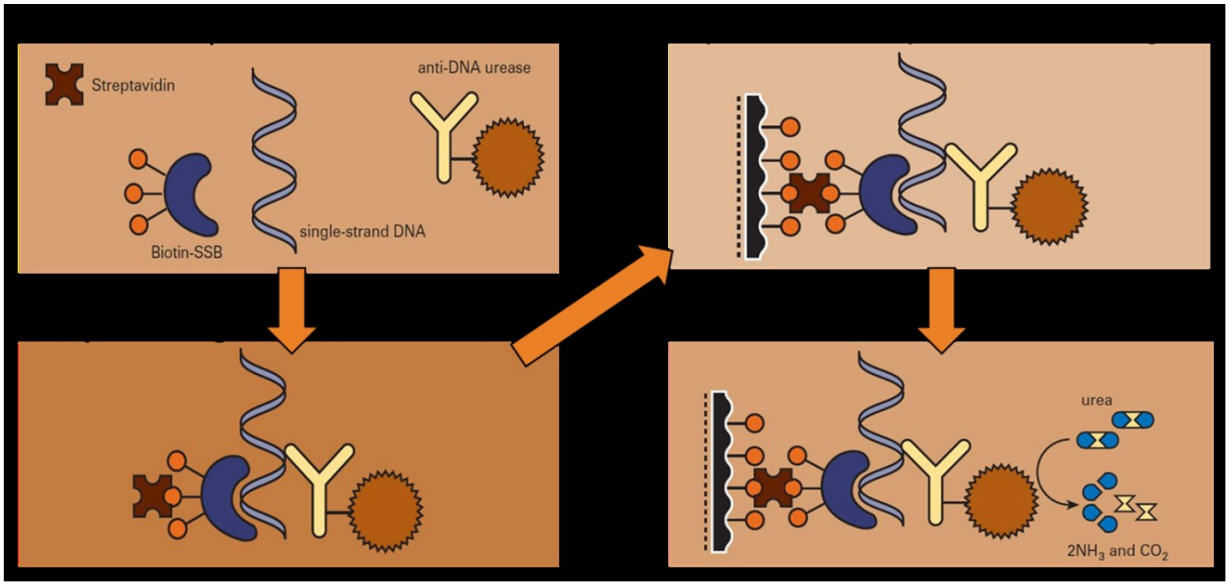


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Prinzips der Threshold-Methode zur Quantifizierung geringer DNA-Mengen. Die Reaktionskomponenten Streptavidin, Biotin-SSB, anti-DNA Urease und einzelsträngige DNA bilden zunächst einen Komplex, der anschließend über eine Bindung des Streptavidin an eine biotinylierte Membran aus der Reaktionslösung separiert wird. Durch Zugabe von Urea kommt es zu einer lokalen Veränderung des pH-Werts, die von einem hoch-sensitiven Sensor detektiert wird. Quelle: [Online] Molecular Devices, Inc., 2010. http://www.moleculardevices.com/Products/AssayKits/ Contaminants/DNA.html

Das Prinzip dieser Methode (siehe Abb. 2.2) beruht auf der Bindung der in der Probe enthaltenen DNA an einen Streptavidin-Biotin-SSB (single-strand-binding) Protein-Komplex und einen anti-DNA-Antikörper, an den eine Urease gekoppelt ist. Der vollständige Komplex wird über das Streptavidin an eine biotinylierte Membran gebunden. Durch Zugabe von Urea auf die Membran wird dieses durch die Urease gespalten und verursacht eine pH-Veränderung. Diese wird durch einen hochsensiblen Sensor detektiert. Durch Anlegen

einer Eichgerade kann die DNA quantifiziert werden. Mit der Threshold Methode können DNA-Konzentrationen bis 3 pg/ml in einer Probe gemessen werden (Molecular Devices, 2010).

Die Eluate der CytoInspect™ Mycoplasma DNA Extraction-Methode, die in dieser Arbeit angewendet wurde (siehe Kapitel 2.6.1), umfassten 50 µl. Um die absolute DNA-Menge in der ursprünglich eingesetzten Probe zu bestimmen, musste die Konzentration (pg/ml), wie sie von der Threshold-Methode angegeben wurde, durch 20 dividiert werden, um die DNA-Menge in den 50 µl Eluat zu erhalten. Anschließend musste noch das ursprüngliche Probenvolumen berücksichtigt werden, aus dem die DNA extrahiert wurde, wenn dieses von 1 ml abwich.

Berechnung der Genomkopien

Zur Berechnung der Genomkopien eines Organismus in einer Lösung benötigt man die DNA-Menge pro Volumen und das Genomgewicht in Gramm (g).

Das Gewicht eines Genoms kann theoretisch nur bestimmt werden, wenn die Genomsequenz, d.h. die Basenpaar (bp)-Abfolge bekannt ist. Dann kann anhand der Anzahl der Basenpaare (N_{bp}) und dem Gewicht pro Basenpaar in g/mol (m_{bp}) die Molmasse des Genoms (M_G) in Gramm (g) errechnet werden. In dieser Arbeit wurde eine durchschnittliche Molmasse pro Basenpaar von 660 g/mol angenommen (Mülhardt, 2003).

$$M_G = N_{bp} \times m_{bp}$$

Dividiert man das Mol-Gewicht (M_G) durch die Anzahl der Teilchen in einem Mol (Avogadrosche Zahl = $6{,}02 \times 10^{23}$), so erhält man das Gewicht eines Genoms (m_G) in Gramm (g).

$$m_G = M_G / 6{,}02 \times 10^{23}$$

Um eine DNA-Menge (pg/ml) in Genomkopien umzurechnen, muss man diese zunächst in g/ml umrechnen.

$$1\ g = 1012\ pg$$

Hat man das zugehörige Genomgewicht (m_G) berechnet, kann man die DNA-Menge in g durch das Genomgewicht (m_G) in g/Genom teilen und erhält die gesuchte Genomanzahl oder Genomkopien (GC).

$$GC = (g/ml) / m_G$$

Die Anzahl der Genomkopien bezieht sich auf das Volumen der Probe vor der DNA-Extraktion.

2.6.4 Zellzahlbestimmung mittels FACS-Analyse

Zur Untersuchung der *Mollicutes*-Suspensionen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Analyse (BD FACSMicroCount™) wurden die Proben zur Fa. BD Diagnostics in Heidelberg verschickt. Das Prinzip der FACS Analyse, auch Durchfluss-Zytometrie genannt, beruht auf der Vereinzelung der in einer Probe enthaltenen Zellen und der anschließenden Detektion der einzelnen Zellen mit einem Laser.

Die Vereinzelung der Zellen wurde mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung durchgeführt. Dabei wurde die flüssige Probe in einen Kanal aus Trägerflüssigkeit injiziert. Die Trägerflüssigkeit ummantelte die Probe und floß zunächst deutlich schneller. Durch die höhere Fließgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit wurde die Probe im Zentrum des Strahls beschleunigt und so zu einem sehr dünnen Strahl auseinander gezogen. In diesem, sich immer weiter verjüngenden Strahl wurden die einzelnen Zellen wie an einer Perlenschnur hintereinander aufgereiht und so vereinzelt (siehe Abb. 2.3).

Detektiert wurden die Zellen mit Hilfe eines Laserstrahls, durch den die Probe geleitet wird. Die Zellen wurden zuvor mit einem membrangängigen, DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der Laser regte die Moleküle an, sodass diese fluoreszierten. Diese Fluoreszenz wurde von einem Sensor gegenüber dem Laser detektiert. Die Intensität des Signals hing von der DNA-Menge in den Zellen ab. Gleichzeitig wurden die zur Seite reflektierten Strahlen, die auch als „Side Scatter“ bezeichnet werden, als Indikator für die Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen gemessen.

Mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff wurde die gesamte Biomasse, d.h. alle Zellen, unabhängig ob sie lebten oder tot waren, gemessen. Um das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen zu bestimmen, wurden in einem zweiten Ansatz nur die toten Zellen gemessen. Durch Zugabe eines DNA-Farbstoffs zur Probe, der die Membran lebender Zellen nicht passieren kann, konnten ausschließlich tote Zellen markiert und gemessen werden. Dies beruhte auf den meist porösen Zellmembranen abgestorbener Zellen. Durch diese konnte der Farbstoff selektiv in die toten Zellen gelangen (Becton Dickenson and Company, 2011).

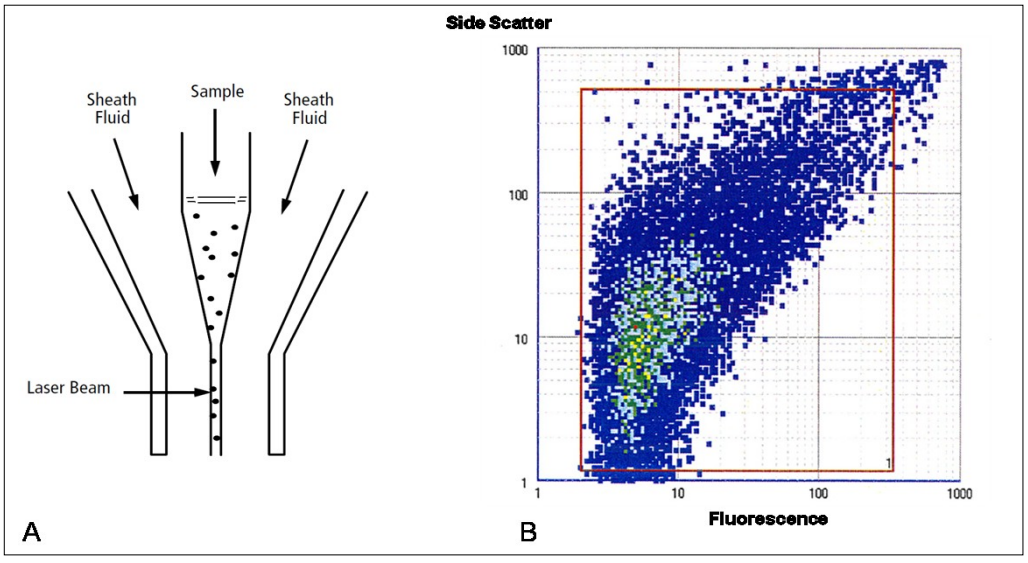


Abb. 2.3: A: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung: Die Probe wird in die Trägerflüssigkeit injiziert. Diese ummantelt die Probe und beschleunigt sie. Dadurch wird die Probe zu einem langen und dünnen Strahl verjüngt, in dem die Zellen wie an einer Perlenschnur aufgereiht und vereinzelt werden. Ein Laser regt die DNA-gebundenen Fluoreszenzmoleküle in den Zellen an. B: Abbildung der Ergebnisse einer FACS Analyse. Die Fluoreszenz (X-Achse) und die zur Seite reflektierten Signale [„side scatter“] (Y-Achse) jeder Zelle werden mit Hilfe von Sensoren gemessen und grafisch als einzelner Punkt pro Zelle abgebildet. Quelle: [Online]Becton,Dickinson and Company, http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSMicroCount_Instrument_Brochure.pdf, 2011

2.7 PCR-basierte Methoden zur Detektion von *Mollicutes*

2.7.1 Das CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kit der Fa. Greiner Bio-One

In dieser Arbeit wurde das CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kit der Fa. Greiner Bio-One als PCR-basierte Detektionsmethode für *Mollicutes* etabliert. Die Durchführung der Methode erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruhte auf der hoch sensitiven, aber relativ unspezifischen Amplifikation der „16S - 23S intergenic spacer“ (ITS) Region des rDNA-Sequenz Clusters der bakteriellen DNA und der hoch spezifischen Detektion der PCR-Produkte der *Mollicutes* mittels Microarray-Analyse (siehe Abb. 2.4).

Bei der PCR-Reaktion handelte es sich um eine „touch-down“ PCR. Dabei wurde die Annealing-Temperatur für die Primer zu Beginn des Programms alle zwei Zyklen von 67 °C schrittweise auf 57 °C reduziert. Anschließend folgten 25 weitere Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C. Die Denaturierung der DNA erfolgt bei 95°C, die Elongation durch die Taq-Polymerase bei 72°C für eine Minute. Für die DNA-Synthese während der PCR-Reaktion wurden, neben den Nukleotiden Adenin, Guanin und Cytosin, Uracil statt Thymin eingebaut. Auf diese Weise unterschieden sich die PCR-Produkte von der Template-DNA aus den *Mollicutes*. Vor dem eigentlichen PCR-Zyklus zur Amplifikation der Zielsequenzen lief ein weiterer Schritt für 15 Minuten bei 37 °C ab. Während dieser Zeit baute eine Uracil-DNA-Glykosylase alle Uracil-haltigen DNA-Fragmente ab. Die Primer der PCR-Reaktion trugen fluoreszierende Moleküle (Cy5), so dass die in der PCR entstehenden DNA-Fragmente anschließend fluoreszenzmarkiert waren.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden nach der PCR maximal für 7 Tage bei -20 °C bis -25 °C gelagert. Auf die PCR folgt die Detektion der entstandenen Produkte mittels Microarray-Analyse. Das PCR-Produkt wurde dazu zunächst mit dem Hybridisierungs-Puffer versetzt und für drei Minuten auf 95 °C erhitzt, um einzelsträngige DNA zu erzeugen. Dieser Mix wurde auf den Microarray gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und unter Lichtabschluss inkubiert.

Die Microarray-Chips des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kits (siehe Abb. 2.5) trugen die Microarrays, die jeweils aus 225 „Spots“ bestanden. Bei diesen Spots handelte es sich um definierte Flächen an festgelegten Positionen, an denen die Sonden fixiert waren. Je fünf nebeneinander liegende Spots trugen dieselbe Sonde. Bei den Sonden handelte es sich um einzelsträngige DNA-Fragmente, die fest auf der speziell beschichteten Kunststoffoberfläche der Chips gebunden waren. Jede der verschiedenen Sonden auf dem Microarray bestand aus einer bestimmten Basenabfolge, die komplementär zu der ITS-Sequenz einer bestimmten *Mollicutes*-Art war. Auf diese Weise wurden insgesamt 39 verschiedene *Mollicutes* auf jedem Microarray des CytoInspect™ Kits codiert, inklusive verschiedener *Acholeplasma* und *Spiroplasma*. Eine universelle Sonde detektierte zusätzlich alle Arten der Klasse *Mollicutes*. Neben diesen spezifischen Sonden trug jeder Spot zusätzlich auch die Sonden für die Hybridisierungskontrolle, die über den Hybridisierungs-

Puffer zu jeder Probe gegeben wurde und mit deren Hilfe die gleichmäßige und vollständige Hybridisierung der PCR-Produkte auf dem Microarray überwacht werden konnte.

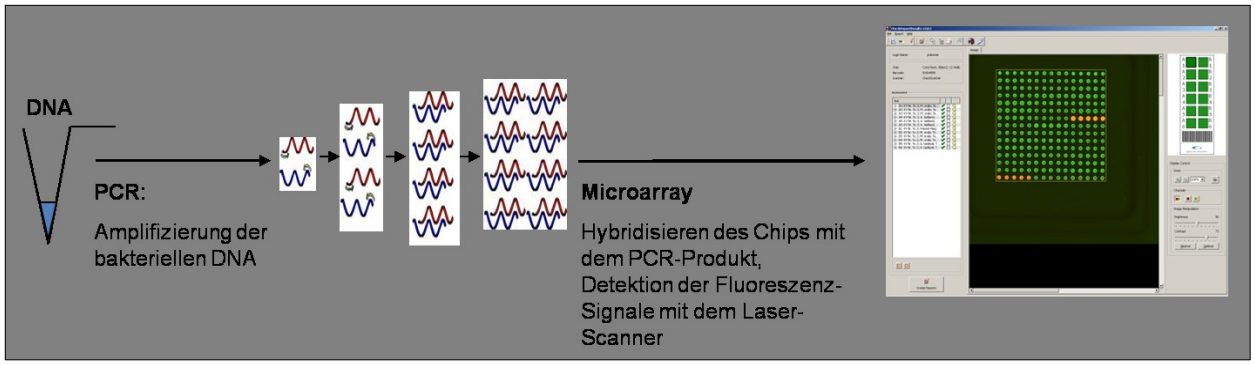


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kits der Fa. Greiner Bio-One. Der DNA Extrakt wird in die 16S - 23S ITS-PCR eingesetzt. Das PCR Produkt wird mit dem Microarray hybridisiert. Die Fluoreszenz-Signale werden mit Hilfe eines Laser-Scanners (CheckScanner™, Fa. Greiner Bio-One) detektiert. Die Auswertung erfolgt automatisch durch die CheckReport™ Software (Fa. Greiner Bio-One).

Nach der Hybridisierung mit den PCR-Produkten wurden die Chips gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Es folgte die Messung der Fluoreszenzsignale auf dem Microarray mit Hilfe eines Laser-Scanners (CheckScanner™, Fa. Greiner Bio-One) und der zugehörigen Software (CheckReport™, Fa. Greiner Bio-One). Über die definierten Positionen der Spots konnten vorhandene Fluoreszenzsignale den entsprechenden *Mollicutes*-Arten zugeordnet und diese so direkt identifiziert werden. Die CheckReport™ Software berechnete für jeden Spot einen sogenannten SNR-Wert (Signal to Noise Ratio), dazu wurde die Hintergrundfluoreszenz um die Spots herum von der Fluoreszenz an den einzelnen Spots abgezogen. Der resultierende SNR-Wert musste bei der universellen Sonde größer als 100 sein, damit die Software die gemessene Fluoreszenz als ein positives Signal erkennt. Bei den spezifischen Sonden reichte dafür ein SNR-Wert von 25 aus. Bei der Anwendung dieser Methode für die Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* bedeutete ein detektierbares Fliuoreszenz-Signal, dass eine Kontamination gefunden wurde und die entsprechende Probe diese Prüfung nicht bestanden hat. Dabei musste nur eine der beiden Sonden (spezifisch/universell) positiv sein, um zu diesem Ergebnis zu kommen.

Die interne und externe Positivkontrolle gemäß E.P. (siehe Kapitel 1.5) bestanden bei diesem Kit aus jeweils einem Plasmid, welche die Primerbindestellen für die spätere PCR-Reaktion trugen. Dazwischen lag eine DNA-Sequenz, die sich deutlich von den PCR-Produkten der *Mollicutes* unterschied. Die interne PCR-Kontrolle überwachte die Extraktion (Extraktions-Positivkontrolle) und wurde bereits während der DNA-Extraktion, nach der initialen Zentrifugtion zu jeder einzelnen Probe gegeben. Die PCR-Positivkontrolle war im PCR Master Mix enthalten und wurde so ebenfalls zu jeder Probe gegeben. In der PCR wurden beide parallel zu der *Mollicutes* DNA in jeder Probe amplifiziert und anschließend auf dem Microarray mit einer

extra Sonde detektiert. Die Extraktions- und PCR-Positivkontrollen wurden extra an fünf spezifischen Positionen neben denen der universellen Sonde der *Mollicutes* detektiert (siehe Abb. 2.5)

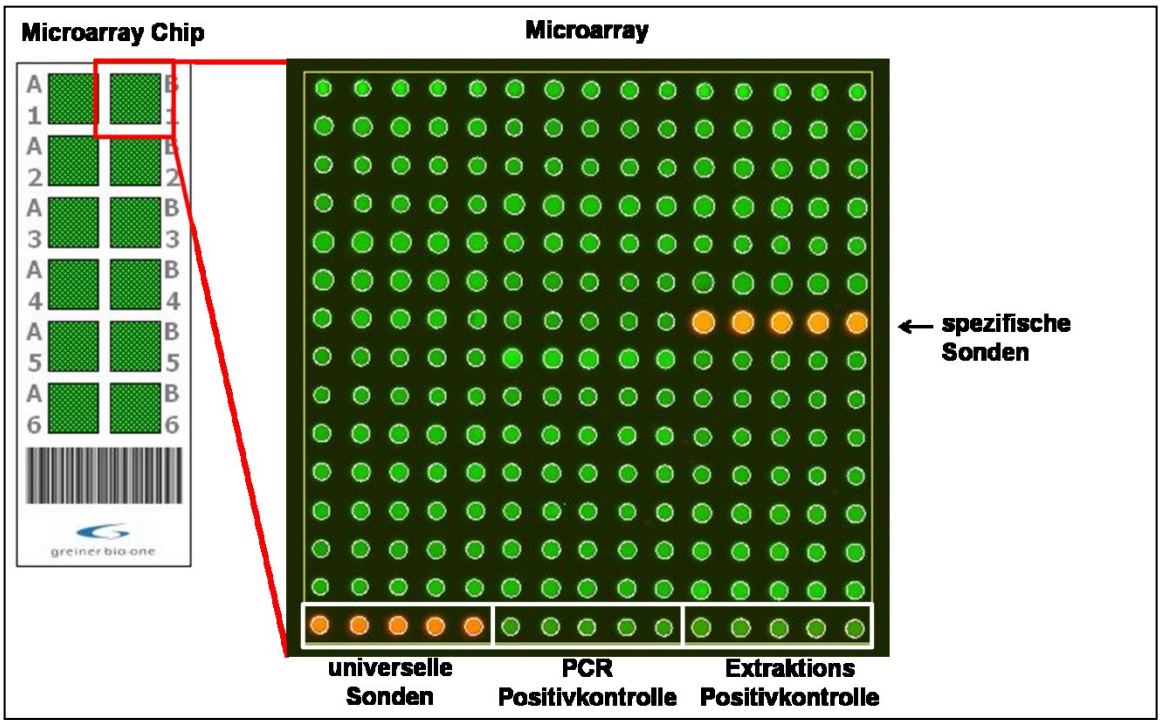


Abb. 2.5: Schematische Darstellung eines Microarray Chips des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kits mit zwölf Microarrays (links) und einer vergrößerten Darstellung eines einzelnen Microarrays (rechts); Auf jedem Microarray sind 225 Spots, von denen jeweils fünf dieselbe Sonde tragen. 39 verschiedene *Mollicutes*-Spezies können mit den artspezifischen Sonden detektiert werden (spezifische Sonden). Zusätzlich können alle *Mollicutes* mit der universellen Sonde nachgewiesen werden. Die Extraktions- und PCR-Positivkontrollen sind neben der universellen Sonde ebenfalls mit jeweils fünf Spots in der untersten Reihe lokalisiert. Alle PCR-Produkte, die mit den Sonden auf dem Chip hybridisieren emittieren eine rote Fluoreszenz, die von den Cy3-Molekülen an den Primer ausgeht. Die Chip-Kontrollen, die die Orientierung des Chips und die gleichmäßige Hybridisierung überprüfen, sind im Hybridisierungs-Puffer enthalten und tragen Cy5-Moleküle die eine grüne Fluoreszenz emittieren.

2.7.2 Das MycoTOOL™ PCR Mycoplasma Detection Kit der Fa. Roche

In dieser Arbeit wurde das MycoTOOL™ PCR Mycoplasma Detektion Kit“ der Fa. Roche als PCR-basierte Detektionsmethode für *Mollicutes* getestet. Die Durchführung des Methode erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit der zu diesem Zeitpunkt aktuellen Version des Protokolls von März 2008 (Roche Diagnostics GmbH, 2008). Das Prinzip dieser Methode beruhte auf der Lyse der Zellen und der Extraktion der DNA aus dem Lysat durch Ausfällen, gefolgt von einer Endpunkt-PCR, deren Produkte mittels Gelelektrophorese detektiert wurden (siehe Abb. 2.6).

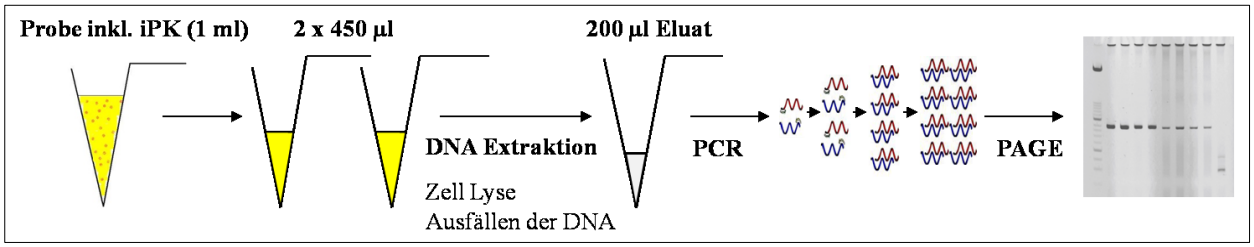


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Prinzips des „MycoTOOL™ PCR Mycoplasma Detection Kits“ der Fa. Roche. Die Zellen aus 2 x 450 µl der Probe werden lysiert und die DNA ausgefällt. Das DNA Pellet wird gewaschen und wieder resuspendiert. Das Eluat wird anschließend mittels PCR amplifiziert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ausgewertet.

Zu Beginn eines Tests wurde zu jeder Probe die interne Positivkontrolle (iPK) in Form eines Plasmids zugegeben. Anschließend wurden 2 x 450 µl (inkl. der iPK) der Probe mit Proteinase K und „Lysis Buffer“ versetzt und die Zellen bei 65 °C lysiert. Anschließend wurde die DNA ausgefällt und bei 16.000 x g pelletiert. Das DNA Pellet wurde dann gewaschen und bei 80 °C eluiert. Dieses Eluat wurde als Template in die PCR eingesetzt. Bei der PCR-Reaktion handelt es sich um eine „touch-down“ PCR, bei der die Annealing-Temperatur für die Primer zu Beginn des Programms alle zwei Zyklen von 70 °C schrittweise auf 61 °C reduziert wurde. Anschließend folgten 25 weitere Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94 °C für 30 Sekunden, die Elongation durch die Taq-Polymerase bei 72 °C für 45 Sekunden. Für die DNA-Synthese während der PCR-Reaktion wurde, neben den Nukleotiden Adenin, Guanin und Cytosin, Uracil statt Thymin eingebaut. Vor dem eigentlichen PCR-Zyklus zur Amplifikation der Zielsequenzen lief ein weiterer Schritt für 5 Minuten bei 40 °C ab, bei dem eine Uracil-DNA-Glykosylase alle Uracil-haltigen DNA-Fragmente abbaute.

Bei jedem Test wurden zwei verschiedene PCR-Reaktionsansätze angelegt. Einer enthielt die Primer zur Amplifikation der *Mollicutes*-DNA, der andere die Primer zur Amplifikation des GAPDH-Gens der CHO-Zellen (iPK). Jedes Eluat aus der Extraktion wurde zweifach in die *Mollicutes*-PCR eingesetzt. Bei diesen Reaktionen entstanden in den *Mollicutes*-haltigen Proben ein 450 bp großes PCR Produkt. Zur Kontrolle der Sensitivität der PCR-Reaktion wurde zweifach eine PCR-Positivkontrolle angesetzt. Dabei handelte es sich um ein Plasmid, welches die Primerbindestellen für die *Mollicutes*-PCR trug und mit einer Konzentration von 10 Kopien/PCR eingesetzt wurde. Ebenfalls zweifach setzte man die Negativkontrolle mit der „Non Template Control“ (NTC) an.

Zusätzlich zu der *Mollicutes*-PCR wurden alle Proben und Kontrollen unverdünnt und 1:1000 verdünnt als Template in die PCR für die iPK eingesetzt. In dieser Reaktion sollten PCR-Produkte mit einer Größe von 350 bp entstehen. Auch für diese Reaktionen wurde eine NTC zur Überprüfung der Reinheit aller PCR-Reagenzien angesetzt. Die Produkte aller PCR-Reaktionen wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese detektiert und ausgewertet, in dem die Größe der PCR-Produkte anhand eines DNA-Größenstandards überprüft wurde.

2.7.3 Das MycoSEQ™ Kit der Fa. Life Technologies

In dieser Arbeit wurde das „PrepSEQ™ *Mycoplasma* Nucleic Acid Extraction Kit“ (Life Technologies, 2008) und das „MycoSEQ™ *Mycoplasma* Real-Time PCR Detection Kit“ (Life Technologies, 2008) der Fa. Life Technologies als PCR-basierte Detektionsmethode für *Mollicutes* getestet. Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit den zu diesem Zeitpunkt aktuellen Versionen der Protokolle von September 2008. Das Prinzip dieses Verfahrens beruhte auf der getrennten Isolierung der *Mollicutes* aus dem Probenüberstand und dem Probenpellet, der anschließenden DNA-Extraktion mittels magnetischer Kügelchen und der finalen Detektion der DNA mittels Real-Time PCR (siehe Abb. 2.7).

Zu Beginn der DNA Extraktion wurden die Proben bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um die eukaryotischen Zellen zu Pelletieren. Anschließend wurden die *Mollicutes* getrennt voneinander aus dem eukaryotischen Zellpellet und dem Überstand isoliert. Dabei wurden aus dem Zellpellet die Zellkerne und damit ein großer Teil der genomische DNA der Zellkultur gezielt aus den Proben entfernt. Die *Mollicutes* aus dem Pellet und dem Überstand wurden anschließend wieder vereint. Erst danach begann die eigentliche DNA-Extraktion. Zu jeder Probe wurde die interne Positivkontrolle zur Überprüfung der DNA-Extraktion in Form eines Plasmids gegeben. Aus dem Lysat wurde die DNA mit Hilfe von „Magnetic Beads“ isoliert, indem die DNA unspezifische an diese gebunden und gewaschen wurde. Abschließend eluierte man die DNA wieder von den „Magnetic Beads“ und setzte sie als Template in die Real-Time PCR ein.

Bei der PCR-Reaktion handelte es sich um eine Real-Time PCR mittels SYBR-Green, deren 40 Zyklen lediglich aus zwei Temperaturschritten bestanden: die Denaturierung fand bei 95 °C für 15 Sekunden statt, das Primer Annealing und die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte in einem gemeinsamen Schritt bei 60 °C für 1 Minute. Im Anschluss erfolgte direkt die Bestimmung der Schmelztemperatur der PCR-Produkte, indem die dsDNA zunächst erneut bei 95 °C für 15 Sekunden denaturiert, dann auf 60° C für 1 Minute abgekühlt und erneut auf 95 °C erhitzt wurde.

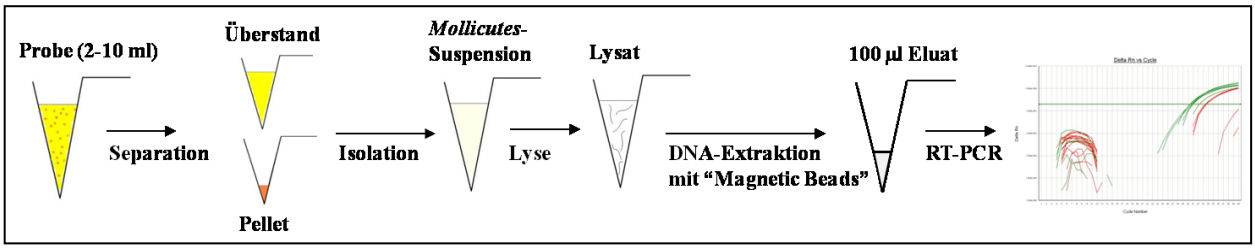


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Prinzips des PrepSEQ™ *Mycoplasma* Nucleic Acid Extraction Kits und des MycoSEQ™ *Mycoplasma* Real-Time PCR Detection Kits der Fa. Life Technologies. Die Proben (2-10 ml) wurden zunächst zentrifugiert und die *Mollicutes* aus dem Überstand und dem Pellet getrennt isoliert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen wieder gepoolt und die Zellen lysiert. Aus dem Lysat wurde mit Hilfe von „Magnetic Beads“ die DNA extrahiert und anschließend mittels Real-Time PCR detektiert.

Jede Probe wurde zweifach in die Real-Time PCR eingesetzt. Zu einem der beiden Ansätze wurde die Inhibitions-Positivkontrolle (Plasmid) gegeben. Diese Kontrolle diente der Überprüfung von inhibitorischen Effekten, verursacht durch die Probenmatrix. Zusätzlich wurden bei jedem Test eine PCR-Negativkontrolle (PCR-Wasser) und eine PCR-Positivkontrolle (Plasmid) mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Betrachtung des C_T-Wertes und der Schmelztemperatur. Lag der C_T - Wert <36 und die Schmelztemperatur T_M zwischen 75 – 85 °C, handelte es sich um einen positiven Test, in dem *Mollicutes* nachgewiesen werden konnten.

2.7.4 Bestimmung der Nachweisgrenze einer Test-Methode

In dieser Arbeit wurde sowohl für den Kultivierungstest zur Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* (siehe Kapitel 2.5.6), als auch für das CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kit der Fa. Greiner Bio-One (siehe Kapitel 2.7.1) die Nachweisgrenze bestimmt.

Für PCR-basierte *Mollicutes* Tests ist die Nachweisgrenze (gemäß E.P. 7.2, Kapitel 2.6.7) die Konzentration eines Zielmoleküls, die in 95 % der Tests nachgewiesen werden kann. Um diese für eine Methode zu bestimmen oder zu validieren, müssen mindestens drei verschiedene Verdünnungen einer 10fach-Verdünnungsreihe des nachzuweisenden Organismus jeweils mehrfach mit der gewünschten Methode getestet werden. Bei den verschiedenen Verdünnungen handelt es sich mindestens um die Konzentration der Nachweisgrenze (95 % positiv), wenn diese bereits bekannt ist, und die jeweils nächst-höhere (100 % positiv) und nächst-niedrigere (< 95 % positiv) 10fach-Verdünnung.

In dieser Arbeit wurde die Nachweisgrenze der Kultivierungsmethode (siehe Kapitel 2.5.6) mit den Konzentrationen 10 KBE/ml, 1 KBE/ml und 0,1 KBE/ml der *Mollicutes* jeweils dreimal, d. h. in drei unabhängigen Verdünnungsreihen, gemessen. Die Nachweisgrenze des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kits wurde mit den Konzentrationen 10 KBE/ml, 3 KBE/ml, 1 KBE/ml, 0.3 KBE/ml und 0.1 KBE/ml jeweils sechsmal gemessen. Dazu wurden drei unabhängige Verdünnungsreihen angelegt, die jeweils zweimal von unterschiedlichen Operatoren getestet wurden. Wenn nötig wurden weitere Verdünnungen mit 0,03 KBE/ml und 0,01 KBE/ml getestet.

Das Anlegen der Verdünnungsreihen erfolgte ausgehend von der in der Wareneingangskontrolle ermittelten Lebendzellzahl der Zellsuspensionen der *Mollicutes* Referenzstandards. Der tatsächliche Titer der Verdünnungen wurde bei jeder Verdünnungsreihe durch eine Titerkontrolle (siehe Kapitel 2.5.2) der 100 KBE/ml Verdünnung überprüft. Dieser musste zwischen 50 und 200 KBE/ml liegen, andernfalls wurden die Verdünnungsreihe und der zugehörige Versuch wiederholt.

Statistische Auswertung der Nachweisgrenzen

Die Berechnung der Nachweisgrenze des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kit der Fa. Greiner Bio-One erfolgte mit Hilfe der Probit-Analyse (SAS Statistical Analysis Software; SAS Institute Inc., Genf/Schweiz). Dazu wurden zunächst für jeden der acht eingesetzten *Mollicutes*-Referenzstandards der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Titer der 100 KBE/ml Verdünnungen berechnet. Mit diesem Mittelwert wurden die nominellen Konzentrationen der Verdünnungen (10 KBE/ml, 3 KBE/ml, 1 KBE/ml, 0.3 KBE/ml und 0.1 KBE/ml), die zur Bestimmung der Nachweisgrenze getestet wurden, in tatsächlich gemessene Konzentrationen umgerechnet. Unter Annahme einer Standard-Normalverteilung für die Konzentrationen der 100 KBE/ml-Verdünnungen wurde dann im Rahmen der Probit-Analyse für jeden der acht Referenzstandards die Konzentration bestimmt, bei der mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % alle Tests positiv waren. Die Nachweisgrenze für den Kultivierungstest wurde als die Konzentration bestimmt, bei der alle drei der durchgeführten Tests positiv waren. Die Berechnung der 95 %-Grenze mittels Probit-Analyse ist bei einer so geringen Anzahl an Wiederholungen nicht sinnvoll.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl einer geeigneten Testmethode

Die Auswahl der geeigneten Testmethode fand in zwei Phasen statt. In der ersten Phase wurde nach kommerziellen Testkits gesucht, die laut Herstellerangaben das in der E.P. geforderte Kriterium der Sensitivität erfüllten. Das heißt die Methoden mussten alle *Mollicutes* nachweisen können und die Sensitivität des Nachweises musste ≤ 10 KBE/ml betragen, um beide offiziellen Methoden zur Chargenfreigabe ersetzten zu können. Nach diesem Kriterium wurden die folgenden drei Methoden ausgewählt:

- MycoTOOL™ PCR *Mycoplasma* Detection Kit; Roche Diagnostics GmbH (Penzberg), siehe Kapitel 2.7.2
- PrepSEQ™ *Mycoplasma* Nucleic Acid Extraction Kit und MycoSEQ™ *Mycoplasma* Real-Time PCR Detection Kit; Life Technologies (Darmstadt), siehe Kapitel 2.7.3
- CytoInspect™ *Mycoplasma* DNA Extraction Kit und CytoInspect™ *Mycoplasma* Detection Kit; Greiner Bio-One (Frickenhausen), siehe Kapitel 2.7.1

In der zweiten Phase wurden die drei ausgewählten „ready to use“-Kits praktisch getestet und miteinander verglichen. Dazu wurden die Spezifität und die Sensitivität genauer betrachtet. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser praktischen Versuche beschrieben.

3.1.1 Vergleich der Spezifität der Methoden

Spezifität bedeutet in diesem Fall, dass ausschließlich *Mollicutes* detektiert werden und keine anderen Bakterien. Auch dürfen die zu testenden Probenmatrizen (Produkte/Produktstufen) keine unspezifischen Signale hervorrufen. So soll vermieden werden, dass es zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Für die Bewertung der Spezifität wurden Zellsuspensionen von sechs verschiedenen Bakterienarten, drei nahen Verwandten der *Mollicutes* und drei Novartis-internen Isolaten des Standort Marburg, mit einer Konzentration von jeweils 10^3 KBE/ml mit allen Kits untersucht. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse für die drei oben genannten Kits dargestellt. Diese Tests sind rein qualitativ durchgeführt worden. Das heißt es wurde geprüft, ob ein Signal detektiert wird oder nicht. Zusätzlich zu den Bakterien wurde die FCC-Virusernte mit den verschiedenen Kits ohne künstlich zugegebene Bakterien getestet, um zu zeigen, dass auch diese keine unspezifischen Signale verursacht. Dies war Voraussetzung für die Untersuchung der Sensitivität (siehe folgendes Kapitel).

Nur zwei der drei Kits zeigten keine unspezifischen Amplifikate bei dem Einsatz der sechs verschiedenen Bakterien-Spezies. Mit dem MycoTOOL™ Kit der Fa. Roche wurden bei den drei Spezies *L. fermentum, S. epidermidis* und *B. thuringiensis* deutliche Banden bei ca. 450 bp im Acrylamidgel sichtbar (siehe Abb.

3.1). Diese Größe entspricht dem PCR-Produkt von *Mollicutes*, wie die Positivkontrolle (*A. laildawii)* zeigt. Für diese Bakterien sind die Primer offenbar so unspezifisch, dass sie an die genomische DNA gebunden haben und PCR-Produkte entstanden. Die drei Bakterien-Spezies *S. bovis, C. sporogenes* und *P. monteilii* waren mit allen drei Kits negativ, ebenso die Probenmatrix der FCC-Virusernte, d. h. hier wurden keine Amplifikate durch unspezifischen Bindung der Primer während der PCR produziert.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchung drei verschiedener „ready to use"-Kits zur Detektion von *Mollicutes.* Sechs verschiedene Bakterien-Spezies und die FCC-Virusernte wurden mit einer Konzentration von 10^3 KBE/ml jeweils vierfach in die Tests eingesetzt. Die Auswertung fand in rein qualitativer Form (+/-) statt.

Spezies/ Matrix	**„ready to use"-Kits zur Detektion von *Mollicutes***		
	MycoTOOL™ Roche	**MycoSEQ™** Life Technologies	**CytoInspect™** Greiner Bio-One
Streptococcus bovis	-	-	-
Clostridium sporogenes	-	-	-
Lactobacillus fermentum	+	-	-
Staphylococcus epidermidis	+	-	-
Bacillus thuringiensis	+	-	-
Pseudomonas monteilii	-	-	-
FCC Virusernte	-	-	-

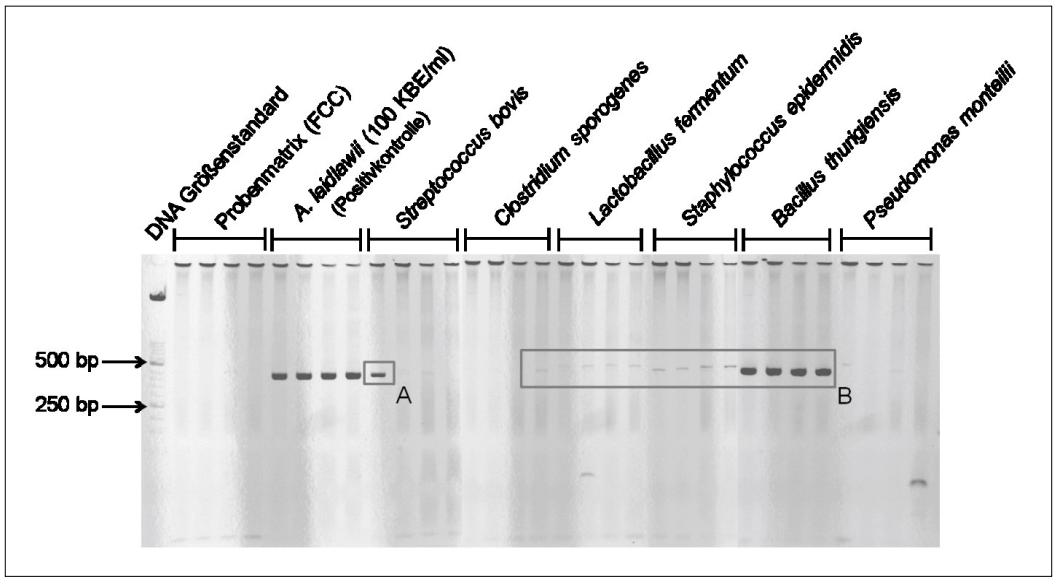


Abb. 3.1: Zusammenstellung von drei Acrylamidgel-Fotografien, die im Rahmen der Spezifitätsanalyse mit dem MycoTOOL™ PCR Mycoplasma Detection Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) produziert wurden. Acht verschiedene Proben wurden jeweils in vier unabhängigen Ansätzen mit dieser Methode getestet. Eine Zellsuspension von *A. laidlawii* wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Probenmatrix (FCC-Virusernte, siehe Kapitel 2.2) wurde ebenfalls auf das Auftreten unspezifischer Signale untersucht. Von den übrigen sechs Bakterien wurden Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 1000 KBE/ml in die Tests eingesetzt. Der DNA-Größenmarker in der linken Spur zeigt die Laufhöhe der DNA Markerbanden bei 500 bp und 250 bp an. A: Kontamination der Probe auf dem Gel durch das PCR Produkt von *A. laidlawii* (Positivkontrolle) aus der benachbarten Spur; B: unspezifische PCR-Produkte mit der gleichen Fragmentgröße, wie die PCR-Produkte der *Mollicutes*.

Bei der deutlich sichtbaren Bande in der ersten der insgesamt vier Spuren von *S. bovis* (siehe Abb. 3.1) handelte es sich um eine Kontamination dieser Probe mit dem PCR-Produkt der Positivkontrolle *A. laidlawii,* die bei der Beladung der Geltaschen übergeschwappt ist. Dies konnte durch die Wiederholung der Gelelektrophorese bestätigt werden. Abb. 3.1 zeigt dennoch das Foto der ersten Gelelektrophorese, da hier deutlich wird, wie leicht es bei dieser Methode zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

3.1.2 Vergleich der Sensitivität der Methoden

Die Sensitivität der drei Kits wurde betrachtet, indem Zellsuspensionen von acht verschiedenen *Mollicutes*-Spezies in drei verschiedenen Konzentrationen (100 KBE/ml, 10 KBE/ml und 3 KBE/ml) mit allen Kits getestet wurden. Jeder Stamm wurde in jeder Konzentration in drei parallelen Ansätzen getestet. Die Probenvolumen betrugen dabei zunächst 1 ml bei dem CytoInspect™ Kit und dem MycoTool™ Kit. Für die Versuche mit dem MycoSEQ™ System mussten 2 x 2 ml, insgesamt also 4 ml eingesetzt werden, um eine vergleichbare Sensitivität zu erzielen. Die Ergebnisse zeigten, dass nur mit dem CytoInspect™ Kit alle acht Arten bis zur niedrigsten Konzentration nachgewiesen wurden. *M. orale* wurde mit dem MycoTool™ Kit bei 3 KBE/ml nicht mehr detektiert. Mit dem MycoSEQ™ System wurden *M. orale* und *M. hyorhinis* nur bis 100 KBE/ml nachgewiesen. Bei dieser Methode fiel weiterhin auf, dass regelmäßig einzelne Proben eines Laufs ungültige Ergebnisse lieferten, da die Inhibitionskontrolle fehlschlug. Da die übrigen Proben und auch die PCR-Positivkontrollen valide waren, bedeutet dies, dass diese Tests offenbar durch Bestandteile der Proben inhibiert wurden.

Weiterhin wurde mit dem MycoSEQ™ System auch getestet, ob das Probenvolumen auf 10 ml erhöht werden kann. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Zahl der Proben mit ungültigen Ergebnissen auf 50 % anstieg. Mit dem CytoInspect™ System der Fa. Greiner Bio-One gelang dagegen die Testung von 10 ml Proben der FCC-Virusernte mit gleicher Sensitivität, wie auch schon bei 1 ml Probenvolumen. Hier war jedoch auch zu beobachten, dass die Lyse der Zellen vor der Extraktion der DNA mit Hilfe der Mini Spin Säulen nicht vollständig verlief und die Säulen zum Teil verstopften. Dennoch war die Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion nicht beeinträchtigt. Mit dem MycoTOOL™ Kit der Fa. Roche ist die Testung von Probevolumina > 1 ml, bzw. > 2 × 450 µl nicht möglich. Daher wurden hier keine anderen Probenvolumina getestet.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Detektion von acht verschiedenen *Mollicutes*-Spezies in drei verschiedenen Konzentrationen mit drei verschiedenen „ready to use"-Kits zur Detektion von *Mollicutes*. Die Auswertung wurde qualitativ durchgeführt: „+" steht für *Mollicutes* detekiert; „ -" steht für *Mollicutes* nicht detektiert.

***Mollicutes*-Spezies**	**Konzentration** KBE/ml	**MycoTOOL™,** Roche	**MircoSEQ™,** Life Technologies	**CytoInspect™,** Greiner Bio-One
Acholeplasma laidlawii ATCC 23206	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma gallisepticum ATCC 19610	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma hyorhinis ATCC 17981	100	+	+	+
	10	+	-	+
	3	+	-	+
Mycoplasma pneumoniae FH ATCC 15531	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma arginini ATCC 23838	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma fermentans ATCC 19989	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma synoviae ATCC 25204	100	+	+	+
	10	+	+	+
	3	+	+	+
Mycoplasma orale ATCC 23714	100	+	+	+
	10	+	-	+
	3	-	-	+

3.2 Etablierung von *Mollicutes* Referenzstandards

3.2.1 Auswahl der *Mollicutes*-Spezies für die Etablierung als Referenzstandards

Die Auswahl der *Mollicutes*-Spezies, die in dieser Arbeit für die Etablierung eines schnellen, PCR-basierten Nachweises von *Mollicutes* eingesetzt werden sollten, richtete sich im Wesentlichen nach den Vorgaben der E.P. 7.2. Dort werden neun verschiedene Spezies als Referenzstandards vorgeschlagen, aus denen der Anwender, je nach Herkunft der Inhaltsstoffe in den zu testenden Proben, die benötigten Spezies auswählen

kann. So muss z. B. *M. synoviae* nur dann eingesetzt werden, wenn die Probenmatrix aviäres Material enthält und *Spiroplasma citrii* nur bei Verwendung von pflanzlichem Material. In Tabelle 3.3 werden alle Rohmaterialien aufgelistet, die zurzeit bei NVD in Marburg zur Produktion zellkulturbasierter Impfstoffe eingesetzt werden und das Risiko tragen, primär mit *Mollicutes* oder ihrer DNA kontaminiert zu sein.

Tabelle 3.3: Auflistung der bei NVD eingesetzten Rohstoffe, die ein Risiko tragen mit *Zellen* bzw. DNA der *Mollicutes* kontaminiert zu sein, inklusive ihrer Herkunft und dem jeweiligen Sterilisationsverfahren.

Rohstoff	**Herkunft**	**Sterilisationsstatus**
Fötales Kälber Serum	Rinder	Gammabestrahltes Rohmaterial
SPF-Bruteier (Specified Pathogen Free)	Hühner	Eier einer Tierärztlich überwachten Hühner-Herde, deren SPF-Status seit mindestens 4 Wochen vor der Eiablage bestätigt ist. Dies beinhaltet unter anderem die Prüfung auf Abwesenheit von *M. gallisepticum* und *M. hyorhinis*, die mittels Serum Plate Agglutinations (SPA) Test durchgeführt wird.
Human-Serum Albumin	Mensch	Rohmaterial für 10 Stunden auf 60°C erhitzt
Haemaccel (Plasmaersatzmittel)	Rind	Verwendeter Rohstoff ist Gelatine, deren Herstellungsverfahren (Säure-oder Base-Behandlung) das Vorhandensein von lebenden *Mollicutes* weitestgehend ausschließt, es werden keine weiteren Sterilisationsverfahren angewandt.
Trypsin	Schwein, Rind	Allgemeine mikrobielle Belastung $<10^4$ KBE/ml, Abwesenheit von *Mollicutes*-Kontaminationen durch den Hersteller überprüft.
Tryptosephosphat-Bouillon	Rind, Schwein	Herstellungsbedingungen (Säure-/ Base- oder Enzymatischer Verdau gefolgt von Ultrazentrifugation) senken die Wahrscheinlichkeit für lebende *Mollicutes*-Kontaminationen.

Dem entsprechend wurden in dieser Arbeit zunächst acht der neun von der E.P. vorgeschlagenen Spezies als Referenzstandards etabliert. Diese wurden in Form von Zellsuspensionen von der Fa. MicroSafe Laboratories (Leiden, Niederlande) hergestellt. *Spiroplasma citrii* wurde ausgeschlossen, da in den zu diesem Zeitpunkt absehbaren, zukünftigen Probenmatrizen kein pflanzliches Material zum Einsatz kommt (siehe Tabelle 3.3). Zusätzlich zu den von der E.P. empfohlenen Arten wurden im Jahr 2011 nachträglich noch zwei weitere *Mollicutes*-Spezies als Referenzstandards etabliert. Diese Entscheidung beruhte auf den Ergebnissen des Technical Report No. 50 der PDA Task Force für alternative *Mollicutes* Testmethoden (PDA, 2010). Bei diesen Arten handelt es sich um die humanen Parasiten *M. salivarium* und *M. hominis*. Diese zwei Referenzstandards wurden von der Fa. Mycosafe (Wien, Österreich), zusammen mit einer zweiten Zellsuspension von *M. pneumoniae* (NCTC 10119), hergestellt. Insgesamt wurden in dieser Arbeit Zellsuspensionen von zehn verschiedenen *Mollicutes*-Spezies als Referenzstandards etabliert

Tabelle 3.4: Auflistung der in dieser Arbeit etablierten *Mollicutes*-Referenzstandards und Beschreibung der Herkunft bzw. ihres häufigsten Vorkommens (Razin & Freundt, 1984).

Spezies	**Herkunft/ Vorkommen**
A. laidlawii	Ubiquitär, in Säugetieren, Vögeln, Insekten, Pflanzen und in Zellkulturen, aber auch in Böden, Kompost und Abwässern; Pathogenität beim Menschen bisher nicht bestätigt.
M. gallisepticum	Im respiratorischen und urogenitalen Trakt von Geflügel; Verbreitung auch über die Eier; in der Regel pathogen, verursacht häufig systemische Infektionen.
M. hyorhinis	Kommt häufig in der Nasenhöhle gesunder und kranker Schweine vor, wurde auch mit systemischen Infektionen z. B. Pneumoniae und Arthritis in Verbindung gebracht; eine der häufigen Kontaminationen von Zellkulturen.
M. pneumoniae	Kommt vor allem bei Menschen aber auch in anderen Säugetieren vor, oft pathogen, bevorzugt die respiratorischen Organen, führt aber auch zu systemischen Infektionen mit Auswirkung auf die inneren Organe und das Nervensystem.
M. arginini	Bei vielen Säugetieren (Ziegen, Schafe, Rinder, Pferde, Schweine, Katzen); ist eine der häufigen Kontaminationen von Rinderserum und Zellkulturen.
M. fermentans	Bei Menschen und Säugetieren, vor allem im urogenitalen Trakt, oft pathogen, eine der häufigsten Kontaminationen in Zellkulturen.
M. synoviae	Häufiger Vertreter im respiratorischen Trakt von Geflügel ohne Krankheits-Symptome, aber auch oft pathogen, dann z. B. im urogenital Trakt, den Gelenken, Schleimbeuteln und Sehnenscheiden sowie in den Eiern.
M. orale	Normaler Bewohner der Schleimhaut im Mundrachenraum von Menschen; bisher sind keine pathogenen Eigenschaften bekannt, eine der häufigen Kontaminationen in Zellkulturen.
M. salivarium	Häufiger Parasit im Mundrachenraum des Menschen, pathogen bisher nur in Verbindung mit anderen, primären Infektionen.
M. hominis	Vor allem im urogenitalen Trakt von Menschen, seltener im Mundrachenraum, in der Regel pathogen, eine der häufigen Kontaminationen in Zellkulturen.

3.2.2 Bestimmung der Überlebensrate der *Mollicutes* Zellsuspensionen

Von allen elf Zellsuspensionen wurden jeweils 500 Aliquots derselben Charge abgefüllt. Bei den Herstellern wurde die Lebendzellzahl (LZZ) vor und nach Einfrieren in mindestens drei der Aliquots gemessen. Die Titer der Zellsuspensionen wurden bei den Herstellern sowohl mit deren eigenen Nährmedien als auch mit den bei Novartis verwendeten Nährmedien der Fa. Heipha gemessen (siehe Kapitel 2.1.3). In Tabelle 3.5 sind die Titer der acht *Mollicutes*-Zellsuspensionen der Fa. MicroSafe Laboratories dargestellt. Es sind keine Unterschiede in den nutritiven und wachstumsfördernden Eigenschaften der Medien zu erkennen, da die Titer der Zellsuspensionen vor und nach dem Einfrieren auf den jeweils verschiedenen Medien nicht maßgeblich voneinander abweichen. Die vom Hersteller gemessenen KBE/ml vor Einfrieren sind etwas höher als die KBE/ml nach Einfrieren, was auf das Absterben der Zellen durch den Einfrierprozess zurück zu führen ist. Lediglich bei *M. pneumoniae* und *M. fermentans* liegt eine starke Reduzierung des Titers nach dem Einfrieren um mehr als 50 % vor.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Titer-Bestimmungen auf Heipha Medien (Friis und Frey) vor und nach dem Einfrieren der Aliquots der *Mollicutes*-Zellsuspensionen, die von MicroSafe Laboratories hergestellten wurden. Bei allen Titern handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen. Zusätzlich wurde die Überlebensrate *der Mollicutes* auf Heipha-Medien berechnet.

Spezies	**Konzentration (KBE/ml)**				**Überlebensrate (%)** Heipha Medien
	Medien des Herstellers		Heipha Medien		
	Vor einfrieren	Nach einfrieren	Vor einfrieren	Nach einfrieren	
A. laidlawii ATCC 23206	$5{,}7 \times 10^6$	$3{,}9 \times 10^6$	$5{,}8 \times 10^6$	$3{,}9 \times 10^6$	67
M. gallisepticum ATCC 19610	$5{,}1 \times 10^4$	$4{,}3 \times 10^4$	$3{,}9 \times 10^4$	$4{,}4 \times 10^4$	113
M. hyorhinis ATCC 17981	$1{,}9 \times 10^6$	$1{,}3 \times 10^6$	$1{,}9 \times 10^6$	$1{,}3 \times 10^6$	68
M. pneumoniae ATCC 15531	$1{,}4 \times 10^4$	$4{,}5 \times 10^3$	$1{,}3 \times 10^4$	$4{,}3 \times 10^3$	33
M. arginine ATCC 23838	$2{,}4 \times 10^4$	$3{,}4 \times 10^4$	$3{,}6 \times 10^4$	$3{,}7 \times 10^4$	103
M. fermentans ATCC 19989	$2{,}5 \times 10^6$	$6{,}8 \times 10^5$	$2{,}4 \times 10^6$	$8{,}2 \times 10^5$	34
M. synoviae ATCC 25204	$4{,}5 \times 10^5$	$4{,}9 \times 10^5$	$4{,}7 \times 10^5$	$4{,}9 \times 10^5$	104
M. orale ATCC 23714	$2{,}6 \times 10^6$	$1{,}2 \times 10^6$	$2{,}5 \times 10^6$	$1{,}3 \times 10^6$	52

Auch bei den in Tabelle 3.6 aufgelisteten *Mollicutes*-Zellsuspensionen der Fa. Mycosafe sind keine Unterschiede in den nutritiven und wachstumsfördernden Eigenschaften der Medien zu erkennen. Die Lebendzellzahlen nach Einfrieren sind hier ebenfalls nur geringfügig niedriger als die Lebendzellzahl vor Einfrieren. Alle drei Zellsuspensionen zeigen eine sehr hohe Überlebensrate.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Titer-Bestimmungen vor und nach dem Einfrieren der Aliquots der *Mollicutes*-Zellsuspensionen, die von Mycosafe hergestellt wurden. Bei allen Titern handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen. Zusätzlich wurde die Überlebensrate *der Mollicutes* auf Heipha-Medien berechnet.

Spezies	**Konzentration (KBE/ml)**				**Überlebensrate (%)** Heipha Medien
	Medien des Herstellers		Heipha Medien		
	Vor einfrieren	Nach einfrieren	Vor einfrieren	Nach einfrieren	
M. pneumoniae NCTC 10119	$3{,}1 \times 10^6$	$2{,}3 \times 10^6$	$2{,}2 \times 10^6$	$2{,}1 \times 10^6$	95
M. salivarium NCTC 10111	$3{,}2 \times 10^5$	$2{,}0 \times 10^5$	$3{,}0 \times 10^5$	$2{,}8 \times 10^5$	93
M. hominis NCTC 10113	$6{,}2 \times 10^7$	$3{,}8 \times 10^7$	$5{,}1 \times 10^7$	$4{,}2 \times 10^7$	82

3.2.3 Berechnung der Wiederfindungsrate der *Mollicutes*-Kryokulturen

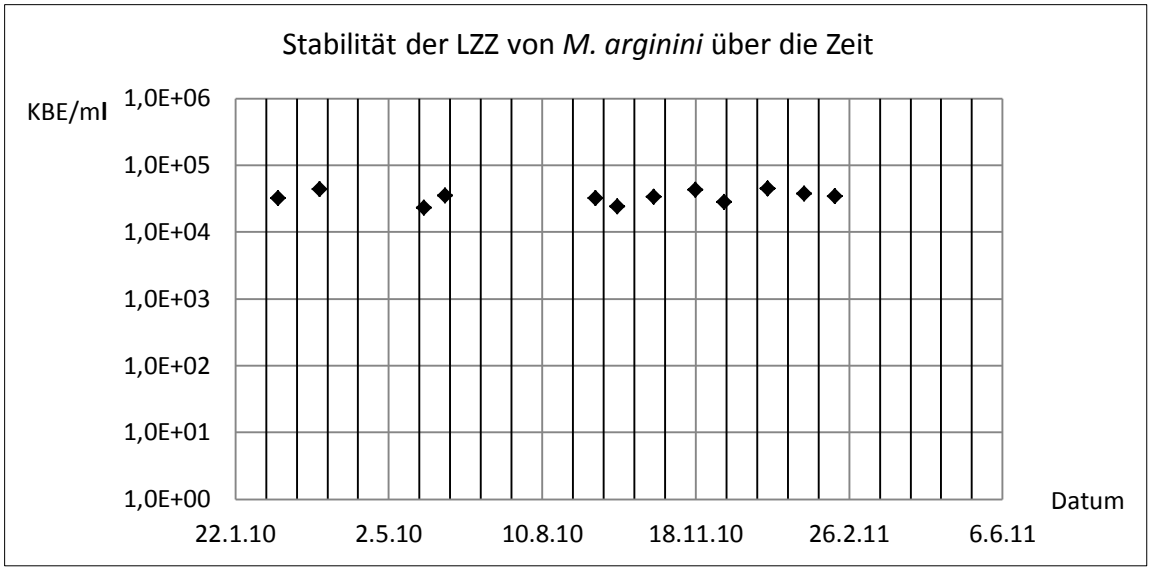
Die Wiederfindungsrate der KBE in den Zellsuspensionen der jeweiligen *Mollicutes*-Spezies wurde aus der vom Hersteller gemessenen Konzentration (KBE/ml) nach Einfrieren der Aliquots und den KBE/ml, die bei NVD im Rahmen der Eingangskontrolle gemessen wurde, berechnet (siehe Tabelle 3.7). Bei neun der elf Zellsuspensionen lag die Wiederfindungsrate zum Teil weit über 100 %, was vermutlich darauf zurück zu führen ist, dass die Zellen bei Novartis im Rahmen der Titerkontrolle stärker vereinzelt wurden. Die geringste Wiederfindungsrate von 12 % zeigte die Zellsuspension von *M. pneumoniae* NCTC 10119. Hier lag die bei NVD gemessene Konzentration der KBE/ml um eine Log-Stufe niedriger, als die KBE/ml die beim Hersteller gemessen wurden. Die Titerkontrolle für diesen Stamm wurde bei Novartis dreifach wiederholt und jedes Mal der niedrige Titer reproduziert. Veränderungen der Testparameter, wie das Erhöhen der Luftfeuchtigkeit in den Inkubatoren, das Erhöhen der Volumen der angelegten Verdünnungen, die Größe der einzelnen Verdünnungsschritte und Inokulieren der Agarplatten ohne Spatel hatten dabei keinen positiven Einfluss auf den Titer der Zellsuspension. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Ursache für die geringe Zellzahl bei dieser Spezies gefunden.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Berechnung der Wiederfindungsrate in Prozent für alle elf *Mollicutes*-Zellsuspensionen, die von den Firmen MicroSafe Laboratories und Mycosafe hergestellt wurden. Dazu wurden die vom Hersteller ermittelten Titer auf Heipha Medien nach Einfrieren und die bei Novartis im Rahmen der Eingangskontrolle bestimmten Titer nach Einfrieren verwendet. Bei allen Titern handelt es sich um den Mittelwert aus mindestens drei einzelnen Bestimmungen.

Hersteller & Spezies		**Konzentration (KBE/ml)** (nach einfrieren)		**Wiederfindungsrate (%)**
		Hersteller	**Novartis**	
MicroSafe Laboratories	*A. laidlawii* ATCC 23206	$3{,}9 \times 10^6$	$8{,}6 \times 10^6$	221
	M. gallisepticum ATCC 19610	$4{,}4 \times 10^4$	$4{,}3 \times 10^4$	98
	M. hyorhinis ATCC 17981	$1{,}3 \times 10^6$	$2{,}1 \times 10^6$	162
	M. pneumoniae ATCC 15531	$4{,}3 \times 10^3$	$6{,}2 \times 10^3$	144
	M. arginini ATCC 23838	$3{,}7 \times 10^4$	$4{,}4 \times 10^4$	119
	M. fermentans ATCC 19989	$8{,}2 \times 10^5$	$2{,}4 \times 10^6$	293
	M. synoviae ATCC 25204	$4{,}9 \times 10^5$	$5{,}6 \times 10^5$	114
	M. orale ATCC 23714	$1{,}3 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$	208
Mycosafe	*M. pneumoniae* NCTC 10119	$2{,}1 \times 10^6$	$2{,}6 \times 10^5$	12
	M. salivarium NCTC 10111	$2{,}8 \times 10^5$	$2{,}1 \times 10^5$	75
	M. hominis NCTC 10113	$4{,}2 \times 10^7$	$5{,}2 \times 10^7$	124

3.2.4 Analyse der Stabilität der Lebendzellzahl

Von den Zellsuspensionen der *Mollicutes* wurde an jedem Arbeitstag ein frisches Aliquot verwendet. Wenn der jeweilige Versuchsansatz es zuließ, wurde der Titer (KBE/ml) des eingesetzten Aliquots berechnet. Anhand dieser Daten konnte die Übereinstimmung der KBE/ml zwischen den einzelnen Zellsuspensionen betrachtet werden. Der Zeitraum, indem die einzelnen Aliquots der von Mycosafe im Jahr 2011 hergestellten Zellsuspensionen in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, ist dabei deutlich kürzer, als der der Zellsuspensionen von MicroSafe Laboratories, die erst seit Mitte 2010 eingesetzt wurden. Graphik 3.1 zeigt am Beispiel von *M. arginini* den Titer von 12 Aliquots, die zwischen 2010 und 2011 eingesetzt wurden. Der Mittelwert (geometrisches Mittel) der Titer dieser Zellsuspension liegt bei $3{,}32 \times 10^4$ KBE/ml, mit einer Standardabweichung (SD) von 0,09. Da die Standardabweichung eines geometrischen Mittels nicht symmetrisch über und unterhalb des Mittelwerts verteilt ist, wird hier zusätzlich das 95 % Konfidenzintervall angegeben. Dieses gibt in Zellzahlen (KBE/ml) den Bereich an, in dem 95 % aller gemessenen Werte liegen. Für die Zellsuspension von *M. arginini* beträgt es $2{,}9 – 3{,}8 \times 10^4$ Zellen/ml. Der Titer dieser Zellsuspension ist dem zu Folge sehr stabil.



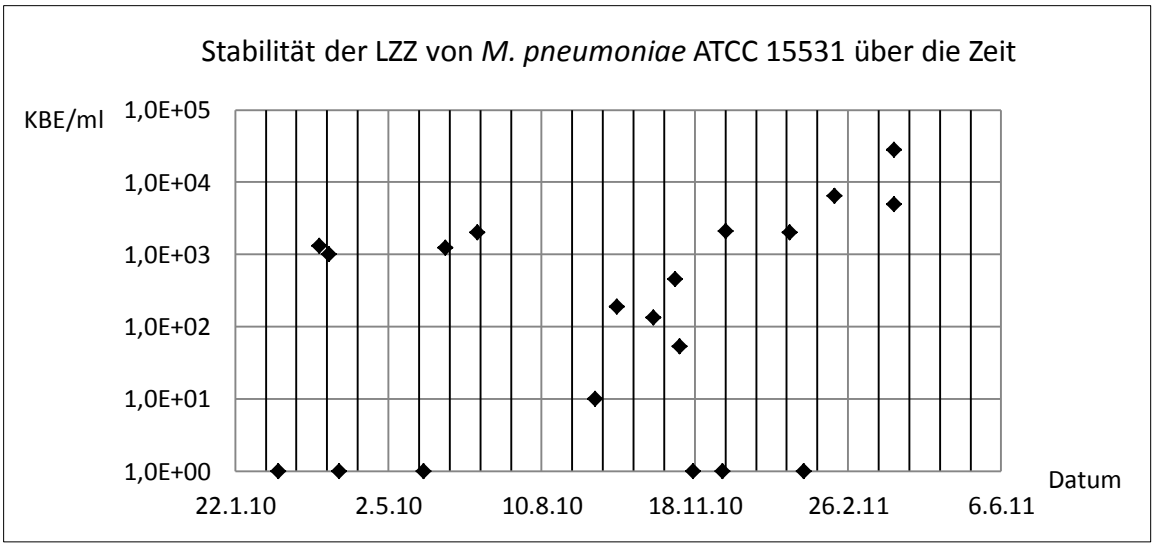
Graphik 3.1: Dargestellt sind die einzelnen Titer der Zellsuspensionen von *M. arginini* (Y-Achse), die in der Zeit von 2010 bis 2011 (X-Achse) gemessen wurden. Der Mittelwert des Titers ist $3{,}32 \times 10^4$ KBE/ml mit einer Standardabweichung von 0,09.

In gleicher Weise wurden die Titer aller Zellsuspensionen ausgewertet. Tabelle 3.8 fasst die Ergebnisse zusammen. Verglichen mit der Zellsuspension von *M. arginini* zeigen die vier Spezies *M. orale, M. synoviae, M. hyorhinis* und *M. fermentans* eine etwas höhere SD zwischen 0,5 und 1,0. Dies ist bei allen drei auf einzelne Aliquots (1 – 2 Werte aus insgesamt 15 – 20) zurück zu führen, deren Titer deutlich, d. h. mindestens um zwei Log-Stufen, vom Mittelwert abweichen. Die übrigen Werte liegen aber sehr nah beim Mittelwert. Am deutlichsten ist dies bei *M. fermentans*, bei dem von 20 Titern einer um 4 Log-Stufen

abweicht. Ohne diesen Wert läge die SD = 0,2. Die Zellsuspensionen der verbleibenden sechs *Mollicutes*-Spezies haben eine Standardabweichung < 0,5, das heißt, es kamen keine stark abweichenden Titer einzelner Aliquots vor.

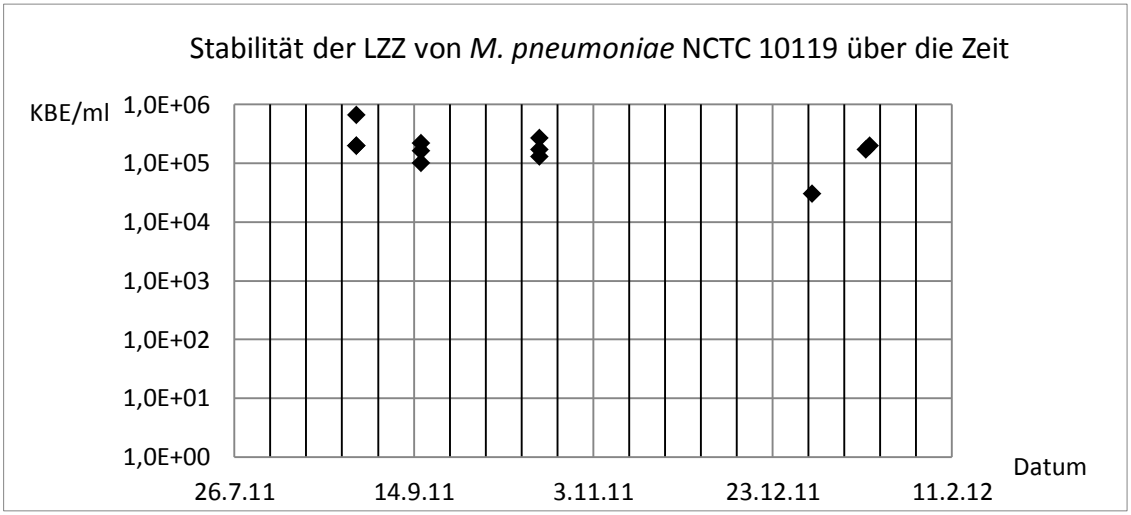
Tabelle 3.8: Übersicht über die geometrischen Mittelwerte der Titer von Februar 2010 bis Anfang 2012, die Standardabweichung (SD) und das 95 % Konfidenzintervall der *Mollicutes*-Zellsuspensionen, die 2010 und 2011 hergestellt und seit dem mehrfach in verschiedenen Versuchen eingesetzt wurden.

Spezies	**Mittelwert KBE/ml**	**Standardabweichung (SD)**	**95 % Konfidenzintervall zum Mittelwert**
A. laidlawii ATCC 23206	$4{,}2 \times 10^6$	0,37	$2{,}9 \times 10^6 – 6{,}2 \times 10^6$
*M. gallisepticum A*TCC 19610	$3{,}53 \times 10^4$	0,12	$3{,}2 \times 10^4 – 3{,}9 \times 10^4$
M. hyorhinis ATCC 17981	$1{,}27 \times 10^5$	0,99	$4{,}7 \times 10^4 – 3{,}5 \times 10^5$
M. pneumoniae ATCC 15531	$9{,}83 \times 10^1$	1,61	$1{,}9 \times 10^1 – 5{,}2 \times 10^2$
M. arginini ATCC 23838	$3{,}32 \times 10^4$	0,09	$2{,}9 \times 10^4 – 3{,}8 \times 10^4$
M. fermentans ATCC 19989	$1{,}05 \times 10^6$	1.02	$3{,}7 \times 10^5 – 3{,}0 \times 10^6$
M. synoviae ATCC 25204	$2{,}54 \times 10^5$	0,86	$1{,}0 \times 10^5 – 6{,}5 \times 10^5$
M. orale ATCC 23714	$1{,}42 \times 10^6$	0,69	$6{,}3 \times 10^5 – 3{,}2 \times 10^6$
M. pneumoniae NCTC 10119	$1{,}7 \times 10^5$	0,31	$1{,}2 \times 10^5 – 2{,}6 \times 10^5$
M. salivarium NCTC 10111	$1{,}81 \times 10^5$	0,19	$1{,}3 \times 10^5 – 2{,}5 \times 10^5$
M. hominis NCTC 10113	$3{,}4 \times 10^7$	0,29	$2{,}1 \times 10^7 – 5{,}6 \times 10^7$



Graphik 3.2: Dargestellt sind die einzelnen Titer der Zellsuspensionen von *M. pneumoniae* ATCC 15531 (Y-Achse), die in der Zeit von 2010 bis 2011 (X-Achse) gemessen wurden. Der Mittelwert der LZZ ist $9{,}83 \times 10^1$ KBE/ml mit einer Standardabweichung (SD) von 1,6.

M. pneumoniae ATCC 15531 wies mit einer SD = 1,6 die größten Schwankungen der Titer zwischen den einzelnen Aliquots auf (siehe Graphik 3.2). Für die Zellsuspension dieses Stammes war es nicht möglich einen einheitlichen Titer zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde eine zweite Zellsuspension von *M. pneumoniae* NCTC 10119 (siehe Graphik 3.3) hergestellt. Der Mittelwert der Titer der einzelnen Aliquots dieser Zellsupension beträgt $1{,}7 \times 10^5$ KBE/ml mit einer Standardabweichung von 0,31. Bis zum Ende dieser Arbeit kamen hier keine stark abweichenden Werte vor.



Graphik 3.3: Dargestellt sind die einzelnen Titer der Zellsuspensionen von M. pneumoniae NCTC 10119 (Y-Achse), die in der Zeit von August 2011 bis Januar 1012 (X-Achse) gemessen wurden. Der Mittelwert der LZZ ist 2,2 × 105 KBE/ml mit einer Standardabweichung (SD) = 0,23.

3.2.5 Betrachtung der Homogenität der koloniebildenden Einheiten innerhalb der einzelnen Aliquots der Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531

Als Ursache für die instabilen Werte der Titer-Bestimmungen der Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531 wurde die Bildung von größeren Zellaggregaten vermutet. Um dies näher zu untersuchen wurde die Homogenität der KBE innerhalb der einzelnen Aliquots dieser Zellsuspension betrachtet. Während der Bestimmung des Titers im Rahmen der Eingangskontrolle der Zellsuspensionen bei NVD wurde nur ein kleiner Teil des Volumens eines Aliquots zum Ansetzen der Verdünnungsreihen verwendet. Für diesen Test wurden dagegen drei Aliquots komplett zu je 10 × 100 µl auf Friis-Agar ausplattiert. Nach 14-tägiger Inkubation wurden die Kolonien auf den Platten gezählt. Die Ergebnisse der Koloniezählung sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Da die Zellsuspensionen unverdünnt auf die Agarplatten ausplattiert wurden, fanden sich auf den meisten Platten mehr als 300 Kolonien, d. h. unzählbar viele bzw. ein Bakterienrasen. Dennoch gab es acht Agarplatten von insgesamt 30 auf denen weniger als 100 Kolonien gewachsen sind. Die geringste Anzahl der Kolonien auf einer Platte betrug 10 KBE. Das heißt, die in 1 ml enthaltenen KBE sind nicht gleichmäßig

über das gesamte Volumen verteilt. Da die Zellsuspensionen vor jedem Arbeitsschritt durch kurzes Vortexen gemischt wurden, bedeutet dies, dass Zellaggregate vorhanden sind. Die Zahl der in den Aggregaten gebundenen Zellen unterscheidet sich um das 10fache und mehr voneinander.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Untersuchung zur Verteilung der KBE in 1 ml Zellsuspension von *M. pneumoniae ATCC 15531*. Es wurden drei Aliquots vollständig zu je 10 × 100 µl auf Friis Agar ausplattiert und nach der Inkubation ausgezählt. Eine Kolonienzahl pro Platte von > 300 bedeutet, dass unzählbar viele Kolonien oder sogar ein Bakterienrasen vorhanden waren.

Aliquot	**Kolonien pro Agarplatte (KBE/ 100 µl)**									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	> 300	> 300	> 300	> 300	42	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
2	33	25	285	10	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	32
3	> 300	> 300	> 300	> 300	51	> 300	11	62	> 300	> 300

3.2.6 Bestimmung der Zellzahl von *M. pneumoniae* mittels FACS-Analyse

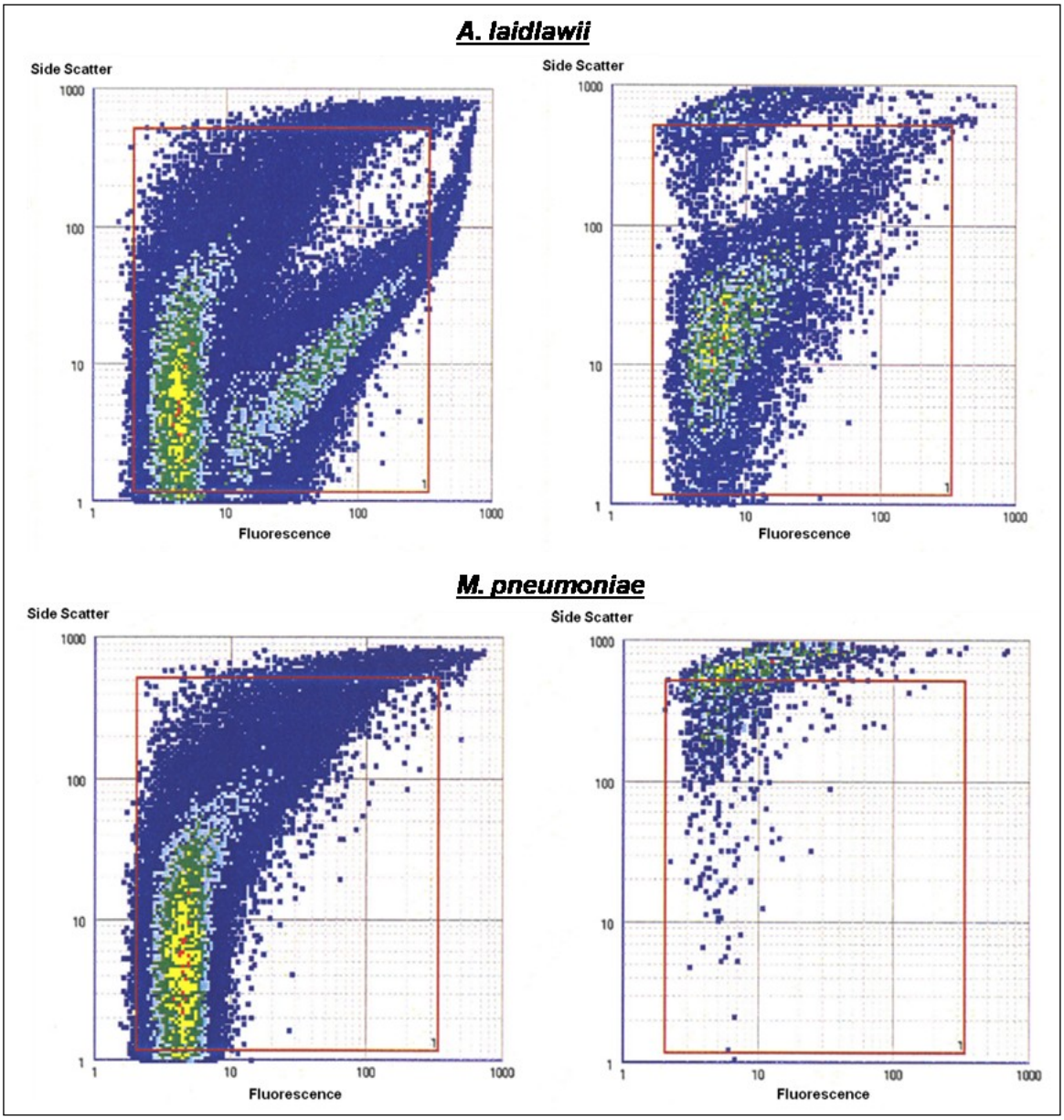
Um weitere Erkenntnisse zum wahren Titer der Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531 zu bekommen, wurde eine Zellzählung mittels FACS-Analyse (Durchfluss-Zytometrie) mit diesem Stamm durchgeführt (siehe Graphik 3.4). Um die Ergebnisse vergleichen und bewerten zu können, wurde die Zellsuspension von *A. laidlawii* ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Für die Berechnung der Lebendzellzahl erfolgte zunächst die Messung der Zellen insgesamt. Das bedeutet alle Zellen wurden mit einem membrangängigen DNA-Farbstoff angefärbt, unabhängig davon, ob die Membran intakt war (→ Zelle lebend) oder nicht (→ Zelle abgestorben). In einer zweiten Messung wurden mit einem DNA-Farbstoff, der intakte Membranen nicht passieren kann, nur abgestorbene Zellen angefärbt, deren Membranen bereits Löcher aufwiesen. Durch Abzug der Zahl der bereits abgestorbenen Zellen von der Zellzahl insgesamt erhielt man die Anzahl der lebenden (intakten) Zellen in der Probe.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Analyse: Indem man zunächst alle Zellen mit einem membrangängigen DNA-Farbstoff markierte, wurde die Zellzahl insgesamt gemessen. In einer zweiten Messung wurden mit einem DNA-Farbstoff, der intakte Membranen nicht passieren kann, nur abgestorbene Zellen angefärbt, deren Membranen bereits Löcher aufwiesen. Durch Abzug der Zahl der bereits abgestorbenen Zellen von der Zellzahl insgesamt erhielt man die Anzahl der lebenden Zellen in den beiden Zellsuspensionen von *A. laidlawii* und *M. pneumoniae*.

Spezies	**GZZ**	**Zahl der toten Zellen**	**LZZ**	**Überlebensrate**
A. laidlawii ATCC 23206	$1{,}7 \times 10^7$	3×10^6	$1{,}3 \times 10^7$	81 %
M. pneumoniae ATCC 15531	$2{,}5 \times 10^7$	2×10^6	$2{,}3 \times 10^7$	93 %

Dieses Verfahren wurde für mehrere Verdünnungen einer 10fach-Verdünnungsreihe der Zellsuspensionen beider Stämme angewandt. Aus den Werten aller Verdünnungen wurde, unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors, der Mittelwert der Zellen insgesamt, der abgestorbenen Zellen und der

lebenden Zellen für die beiden Stämme *M. pneumoniae* und *A. laidlawii* berechnet. Tabelle 3.10 fasst die Ergebnisse dieser FACS-Analysen zusammen. Der Anteil der lebenden Zellen beträgt demzufolge bei *A. laidlawii* 81 % und bei *M. pneumoniae* 93 %, bei einer Gesamtzellzahl (GZZ) von $1{,}7 \times 10^7$ Zellen, respektive $2{,}5 \times 10^7$ Zellen.



Graphik 3.4: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse: Auf der X-Achse wird die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, die von der markierten DNA in den Zellen abgegeben wird; auf der Y-Achse die Stärke des „side scatter", d. h. die Reflektion, die von der angestrahlten Oberfläche der Zellen ausgeht. Jeder Punkt stellt eine Zelle dar. Je weiter rechts die Punkte sind, umso stärker ist die Fluoreszenz, was auf mehr DNA in den Zellen hin deutet. Je weiter oben die Punkte sind, umso stärker der „side scatter" und umso mehr wird von der Oberfläche reflektiert. Die oberen zwei Bilder stellen eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension von *A. laidlawii* da, die Unteren eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension von *M. pneumoniae*, links ist jeweils die Gesamtzellzahl gemessen worden, rechts die Zahl der abgestorbenen Zellen. Das Prinzip dieser Messungen beruht auf einem membrangängigen DNA-Farbstoff, der alle Zellen einer Probe anfärbt und einem zweiten Farbstoff, der die Membranen nicht passieren kann und so nur die Zellen anfärbt, deren Membran bereits Löcher aufweist, also bereits abgestorbene Zellen.

3.2.7 Bestimmung der Genomkopien pro koloniebildenden Einheiten

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts (g/ml) der zehn *Mollicutes*-Zellsuspensionen musste die Threshold-Methode eingesetzt werden, da durch die zum Teil sehr geringen Zellzahlen und die extrem kleinen Genome der *Mollicutes* nur sehr wenig DNA in den Aliquots der Zellsuspensionen erwartet wurde. Photometrische Methoden und auch die DNA-Quantifizierung mittels Pico-Green kamen dadurch nicht in Frage. Das Prinzip der Threshold-Methode (siehe Abb. 2.2) beruht auf der Bindung der in der Probe enthaltenen DNA an einen Streptavidin-Biotin-SSB (single-strand-binding) Protein-Komplex und einen anti-DNA-Antikörper, an den eine Urease gekoppelt ist. Der vollständige Komplex wird über das Streptavidin an eine biotinylierte Membran gebunden. Durch Zugabe von Urea auf die Membran wird dieses durch die Urease gespalten und verursacht eine pH-Veränderung. Diese wird durch einen hochsensiblen Sensor detektiert. Durch Anlegen einer Eichgerade kann die DNA quantifiziert werden. Mit der Threshold-Methode können DNA-Konzentrationen bis 3 pg/ml in einer Probe gemessen werden (Molecular Devices, 2010)

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Bestimmung der Anzahl der Genomkopien (GC/ml) in den Zellsuspensionen der *Mollicutes*-Referenzstandards

Spezies	**bp/Genom**	**Mol/Genom**	**g/Genom**	**DNA/Zellsuspension** (g/ml)	**GC/ml Zellsuspension**
A. laidlawii ATCC 23206	1496992	988014720	$1{,}64 \times 10^{-15}$	$3{,}2 \times 10^{-8}$	$1{,}96 \times 10^{7}$
M. gallisepticum ATCC 19610	1012027	667937820	$1{,}11 \times 10^{-15}$	$1{,}05 \times 10^{-10}$	$9{,}46 \times 10^{4}$
M. hyorhinis ATCC 17981	799476	527654160	$8{,}77 \times 10^{-16}$	$5{,}68 \times 10^{-10}$	$6{,}48 \times 10^{5}$
M. pneumoniae ATCC 15531	811088	535318080	$8{,}89 \times 10^{-16}$	$1{,}65 \times 10^{-9}$	$1{,}86 \times 10^{6}$
M. arginini ATCC 23838	720000	475200000	$7{,}89 \times 10^{-16}$	$1{,}2 \times 10^{-10}$	$1{,}79 \times 10^{5}$
M. fermentans ATCC 19989	800000	528000000	$8{,}77 \times 10^{-16}$	$4{,}13 \times 10^{-9}$	$5{,}24 \times 10^{6}$
M. synoviae ATCC 25204	610000	402600000	$6{,}69 \times 10^{-16}$	$3{,}1 \times 10^{-9}$	$3{,}54 \times 10^{6}$
M. orale ATCC 23714	710000	468600000	$7{,}78 \times 10^{-16}$	$1{,}42 \times 10^{-9}$	$1{,}82 \times 10^{6}$
M. pneumoniae NCTC 10119	811088	535318080	$8{,}89 \times 10^{-16}$	$2{,}15 \times 10^{8}$	$2{,}42 \times 10^{7}$
M. salivarium NCTC 10111	710000	468600000	$7{,}78 \times 10^{-16}$	$1{,}42 \times 10^{9}$	$1{,}82 \times 10^{6}$
M. hominis NCTC 10113	665445	488400000	$8{,}11 \times 10^{-16}$	$8{,}83 \times 10^{8}$	$1{,}09 \times 10^{8}$

Aus dem Gewicht pro Genom und dem DNA-Gehalt pro Aliquot wurde die Anzahl der Genomkopien für jede der insgesamt elf Zellsuspensionen berechnet (siehe Kapitel 2.6.3). Tabelle 3.11 gibt einen Überblick über die für die Berechnung zugrunde gelegten Daten und die Ergebnisse.

Anhand des Titers in KBE/ml (gemessen bei Novartis) und den Genomkopien/ml pro Aliquot der *Mollicutes* Zellsuspensionen wurde das Verhältnis der Genomkopien pro koloniebildender Einheit (GC/KBE) berechnet (siehe Tabelle 3.12). Zusätzlich ist auch das GC/KBE-Verhältnis unter Berücksichtigung des Titers aus der Stabilitätsstudie berechnet worden.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Berechnung des GC/KBE-Verhältnisses in den Zellsuspensionen der elf *Mollicutes*-Referenzstandards, basierend auf dem Titer der Eingangskontrolle (LZZ) bei NVD. Zusätzlich wurden die GC/KBE-Verhältnisse, basierend auf den Titern der Stabilitätsstudie, berechnet.

Spezies	**Eingangskontrolle**		**Stabilitätsstudie**	
	Titer*	GC/KBE	Titer**	GC/KBE
A. laidlawii ATCC 23206	$8{,}6 \times 10^6$	2,3	$4{,}2 \times 10^6$	4,7
M. gallisepticum ATCC 19610	$4{,}27 \times 10^4$	2,2	$3{,}53 \times 10^4$	2,7
M. hyorhinis ATCC 17981	$2{,}1 \times 10^6$	0,3	$1{,}27 \times 10^5$	5,1
M. pneumoniae ATCC 15531	$6{,}23 \times 10^3$	298,5	$9{,}83 \times 10^1$	18921,7
M. arginini ATCC 23838	$4{,}4 \times 10^4$	4,1	$3{,}32 \times 10^4$	5,4
M. fermentans ATCC 19989	$2{,}42 \times 10^6$	2,2	$1{,}05 \times 10^6$	5,0
M. synoviae ATCC 25204	$5{,}57 \times 10^5$	6,4	$2{,}54 \times 10^5$	13,9
M. orale ATCC 23714	$2{,}71 \times 10^6$	0,7	$1{,}42 \times 10^6$	1,3
M. pneumoniae NCTC 10119	$2{,}6 \times 10^5$	94,8	$1{,}7 \times 10^5$	143
M. salivarium NCTC 10111	$2{,}1 \times 10^5$	8,6	$1{,}81 \times 10^5$	10,1
M. hominis NCTC 10113	$5{,}20 \times 10^7$	2,1	$3{,}4 \times 10^7$	3,2

* Siehe Tabelle 3.5 & Tabelle 3.6; ** Siehe Tabelle 3.8

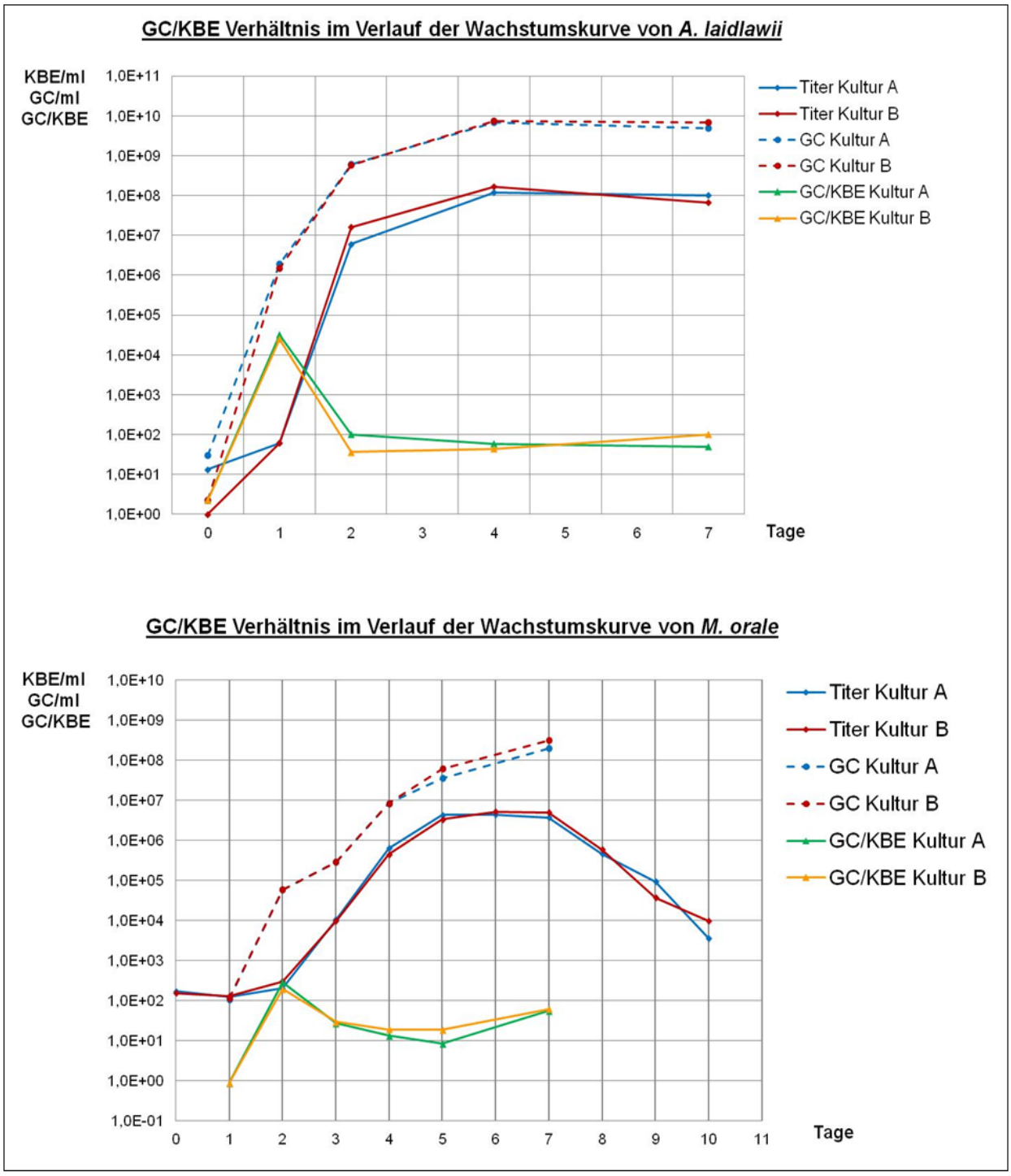
Basierend auf dem Titer der Eingangskontrolle liegen die GC/KBE-Verhältnisse von acht der elf Zellsuspensionen unter zehn, das heißt pro KBE sind weniger als 10 GC enthalten. Die Werte für *M. hyorhinis* und *M. orale* liegen unter 1. Dies ist praktisch nicht möglich, da jede KBE mindestens eine Genomkopie enthält. Die Stabilitätsstudie, in der die Titer vieler einzelner Aliquots der Zellsuspensionen über einen längeren Zeitraum betrachtet wurden (siehe Kapitel 3.2.4), zeigte, dass die KBE/ml nach dem Einfrieren mit der Zeit leicht absinken. Berücksichtigt man diesen niedrigeren Titer für die Berechnung der GC/KBE-Verhältnisse (siehe Tabelle 3.12), steigen die Werte bei allen zehn *Mollicutes*-Arten an. Auch die Zellsuspensionen der Spezies *M. hyorhinis* und *M. orale* zeigen nun einen realistischen Wert von 5 bzw. 1 GC/KBE.

Auffällig ist *M. pneumoniae* ATCC 15531, der ein GC/KBE-Verhältnis von knapp 300 zeigt. Die Stabilitätsstudie hat gezeigt, dass hier kein verlässlicher Titer bestimmt werden kann. Während in der Eingangskontrolle noch ein Titer von $6{,}23 \times 10^3$ gemessen wurde, lag der Mittelwert des Titers bei der Stabilitätsstudie bei nur noch 98 KBE/ml. Dem entsprechend ist auch das GC/KBE-Verhältnis dieser Zellsuspension nicht repräsentativ für die einzelnen Aliquots. Auch die 2011 hergestellte Zellsuspension von *M. pneumoniae* NCTC 10119 zeigt noch immer ein sehr hohes GC/KBE-Verhältnis (140 GC/KBE bzw. 95 GC/KBE. Auch hier liegt die Ursache bei der Lebendzellzahl nach Einfrieren, die in der Eingangskontrolle bei Novartis in Marburg gemessen wurde. Diese beträgt nur etwa 10 % der LZZ nach Einfrieren, die beim Hersteller der Zellsuspension gemessen wurde. Dieser Faktor 10 ist auch bei dem GC/KBE-Verhältnis zu sehen, das anders bei ca. 10 GC/KBE läge und so mit denen der anderen neun *Mollicutes*-Spezies vergleichbar wäre.

3.2.8 Untersuchung des optimalen Erntezeitpunktes für *Mollicutes* Referenzstandards

Das GC/KBE-Verhältnis einer Zellsuspension hängt maßgeblich von der Phase der Wachstumskurve ab, in der die Zellsuspension geerntet wird. Um dies zu zeigen, wurde die Veränderung des GC/KBE-Verhältnisses wachsender Kulturen von zwei *Mollicutes*-Spezies gemessen. Dazu wurde täglich der Titer (KBE/ml) in drei parallelen Kulturen von beiden Stämmen gemessen und Proben für die Bestimmung der Genomkopien (GC/ml) genommen. Nach Betrachtung der Wachstumskurven wurden exemplarische Proben für die GC-Bestimmung aus jeweils zwei Kulturen ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Graphik 3.5 dargestellt.

Die GC/KBE-Verhältnisse zeigen bei beiden Stämmen einen deutlich Peak beim Übergang von der lag-Phase zur exponentiellen Phase, in der die Genomkonzentration zunächst schneller ansteigt, als die KBE/ml. Zwischen Mitte und Ende dieser Wachstumsphase gleichen sich die beiden Parameter wieder aneinander an, sodass das GC/KBE-Verhältnis sinkt. In der stationären Phase ist die Zellteilungsrate gleich der Sterberate, so dass der Titer (KBE/ml) gleich bleibt. Dies ist besonders bei *A. laidlawii* zu sehen, da dieser eine sehr lange Plateau-Phase hat. Da die DNA der abgestorbenen Zellen aber noch immer in den Kulturen vorhanden ist, können in dieser Phase die GC/ml weiter langsam ansteigen. Dies ist bei *M. orale* gut zu beobachten. Erst wenn gegen Ende der stationären Phase der Titer wieder absinkt, steigt das GC/KBE-Verhältnis deutlich an. Dies ist nur bei *M. orale* zu sehen, da *A. laidlawii* während dieser Studie die Absterbe Phase nicht erreicht und nur ein minimaler Abfall des Titers zu beobachten ist.



Graphik 3.5: Betrachtung des GC/KBE-Verhältnisses im Verlauf der Wachstumskurve von *A. laidlawii* (oben) und *M. orale* (unten): Abgebildet sind die Wachstumskurven von jeweils zwei parallel angesetzten Kulturen von *A. laidlawii* in 800 ml Friis Medium und *M. orale* in 100 ml Frey Medium. Inokuliert wurden die Kulturen mit der entsprechenden Menge eines frisch aufgetauten Aliquots der jeweiligen Zellsuspension, sodass eine Zielkonzentration von ca. 100 KBE/ml erreicht wurde. Parallel wurden die Genomkopien (GC/ml) in den Kulturen gemessen und das GC/KBE-Verhältnis berechnet.

Der optimale Erntezeitpunkt für *Mollicutes* Referenzstandards zur Etablierung einer PCR-basierten Methode liegt bei dem Punkt der Wachstumsphase, in der das GC/KBE-Verhältnis am niedrigsten ist. Anhand der hier ermittelten Daten liegt dieser Punkt in der mittleren bis späten exponentiellen Wachstumsphase. *M. orale* enthielt in dieser Phase ca. 10 GC/KBE, *A. laidlawii* ca. 50 - 100 GC/KBE. Bei der Herstellung der zehn Referenzstandards für diese Arbeit musste dies eingehalten werden. Dazu wurde zunächst die Wachstumskurve für jede einzelne Spezies von den Herstellern der Zellsuspensionen gemessen, um davon ausgehend den unter den jeweiligen Bedingungen optimalen Zeitpunkt zu ermitteln. In Tabelle 3.13 sind die Zeiträume in Stunden ab der Inokulation, in denen sich die verschiedenen *Mollicutes* in der mittleren bis späten Wachstumsphase befinden und die Erntezeitpunkte der Zellsuspensionen angegeben.

Tabelle 3.13: Übersicht über die verschiedenen Zeiträume, in denen sich die *Mollicutes*-Spezies, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, in der mittleren bis späten, exponentiellen Wachstumsphase befinden und den jeweiligen Erntezeitpunkt der Zellsuspensionen. Alle Angaben wurden von den Herstellern der Zellsuspensionen übernommen und in Stunden ab der Inokulation angegeben.

Hersteller & *Mollicutes* Spezies		**Exponentielle Wachstumsphase**	**Erntezeitpunkt der Zellsuspensionen**
MicroSafe Laboratories	*A. laidlawii ATCC 23206*	24 - 48	43
	M. gallisepticum ATCC 19610	24 - 72	49
	M. hyorhinis ATCC 17981	24 - 72	49
	M. pneumoniae ATCC 15531	48 - 144	96
	M. arginini ATCC 23838	24 - 48	26
	M. fermentans ATCC 19989	24 - 72	51
	M. synoviae ATCC 25204	48 - 72	48
	M. orale ATCC 23714	24 - 72	46
Mycosafe	*M. pneumoniae NCTC 10119*	48 – 120	108
	M. salivarium NCTC 10111	24 – 96	66
	M. hominis NCTC 10113	24 – 72	48

3.3 Evaluierung der ausgewählten Methode als Prüfverfahren zur Chargenfreigabe

Durch eine **Validierung** wird nachgewiesen und dokumentiert, dass ein Verfahren mit angemessen großer Sicherheit reproduzierbare Ergebnisse liefert. Diese müssen den zuvor festgelegten oder vorgegebenen Kriterien und deren Spezifikationen entsprechen. In der Validierung einer PCR-basierten Methode zur Prüfung auf Abwesenheit von *Mycoplasma* müssen gemäß E.P. die Spezifität, die Robustheit und die Sensitivität der Methode gezeigt werden. Die Spezifikationen (Grenzwerte) für diese Kriterien wurden in

dieser Arbeit im Rahmen von Prävalidierungsstudien untersucht und festgelegt. In diesen Studien wurden außerdem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit verschiedenen Probenmatrizen und die Vergleichbarkeit der Methode mit den bisherigen Verfahren untersucht.

In der ersten Studie wurde die Sensitivität, die Spezifität und die Robustheit der Methode getestet (siehe folgende Kapitel 3.3.1 und 3.3.3). Dabei wurden die acht *Mollicutes*-Referenzstandards eingesetzt, die bereits im Jahr 2010 hergestellt wurden. Alle Tests in dieser Studie wurden mit Proben der Rabies-Virusernte (siehe Kapitel 2.2) als Probenmatrix durchgeführt. In einer zweiten Prävalidierungsstudie wurde die Anwendbarkeit der Methode für weitere Probenmatrizen evaluiert (siehe Kapitel 3.3.4). Die Zahl der eingesetzten *Mollicutes*-Referenzstandards wurde in dieser Untersuchung auf drei Stämme reduziert. Die dritte Studie diente zur Verifizierung der Sensitivität der Methode mit drei neuen Referenzstandards, die erst 2011 hergestellt wurden. Die Ergebnisse der drei Prävalidierungsstudien werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.3.1 Bestimmung der Sensitivität

Die Nachweisgrenze des CytoInspect™ Mycoplasma Detection Kits wurde zunächst mit acht Referenzstandards gemessen. Dazu wurden, von jedem der acht Stämme jeweils drei unabhängige Verdünnungsreihen an drei verschiedenen Tagen angelegt und die einzelnen Verdünnungen jeweils zweimal von zwei verschiedenen Operatoren getestet. So wurden pro Stamm für jede Verdünnung insgesamt sechs Tests durchgeführt, deren Ergebnisse entweder als positiv (*Mollicutes* detektiert) oder negativ (keine *Mollicutes* detektiert) bewertet wurden. Anhand dieser Daten wurde die Nachweisgrenze als Konzentration in KBE/ml berechnet, bei der 95 % aller Tests positiv waren. Im Rahmen der dritten Prävalidierungsstudie wurde diese Nachweisgrenze für die drei neuen Referenzstandards in geringerem Umfang verifiziert. Hier wurde jede Verdünnung pro Stamm lediglich dreimal statt sechsmal getestet. Die Nachweisgrenze für diese Standards entsprach der Verdünnung bei der alle drei Tests positiv waren, d. h. 100 % detektiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst. Die höchste Sensitivität entsprach der niedrigsten Nachweisgrenze und umgekehrt. Demzufolge war die Sensitivität des CytoInspect™ Kits bei *M. fermentans* und *M. pneumoniae* mit 0,1 KBE/ml am höchsten, bei *M. gallisepticum* mit 4,5 KBE/ml dagegen am niedrigsten. Als generelle Nachweisgrenze des CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One für *Mollicutes* wurde in dieser Studie also ein Wert von ca. 5 KBE/ml bestimmt.

Anhand des GC/KBE-Verhältnisses der Referenzstandards (siehe Kapitel 3.2.7) wurde die Nachweisgrenze in GC/ml umgerechnet. Dazu wurde in der ersten Berechnung das GC/KBE-Verhältnis berücksichtigt, das auf der LZZ basiert, die bei NVD in Marburg im Rahmen der Eingangskontrolle gemessen wurde. In einem zweiten Ansatz wurde die Nachweisgrenze in GC/ml erneut berechnet, dieses Mal unter Einbeziehung der GC/KBE-Verhältnisse, deren LZZ in der Stabilitätsstudie bestimmt wurden. Tabelle 3.15 fasst die Ergebnisse der Berechnung der Nachweisgrenzen in GC/ml zusammen. Die Nachweisgrenze der Methode für die zehn eingesetzten *Mollicutes* Referenzstandards lag bei ≤ 30 GC/ml.

Tabelle 3.14: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Sensitivität des CytoInspect™ Kits. Jede Nachweisgrenze in KBE/ml stellt den Mittelwert aus sechs einzelnen Test (erste Prävalidierungsstudie) bzw. drei einzelnen Tests (dritte Prävalidierungsstudie) dar. Die Konzentration der Nachweisgrenze ist die, bei der in allen Tests die jeweiligen *Mollicutes* positiv detektiert wurden. Da das Probenvolumen 10 ml betrug, sind auch Nachweisgrenzen <1 KBE/ml möglich.

Studie	***Mollicutes*-Spezies**	**Nachweisgrenze (KBE/ml)**
Erste Prävalidierungsstudie	*A. laidlawii* ATCC 23206	0,4
	M. gallisepticum ATCC 19610	4,5
	M. hyorhinis ATCC 17981	1,2
	M. pneumoniae ATCC 15531	0,1
	M. arginini ATCC 23838	0,4
	M. fermentans ATCC 19989	0,1
	M. synoviae ATCC 25204	0,5
	M. orale ATCC 23714	1,5
Dritte Prävalidierungsstudie	*M. pneumoniae* NCTC 10119	< 0,2
	M. salivarium NCTC 10111	< 0,3
	M. hominis NCTC 10113	0,7

In Kapitel 3.2.5 und 3.2.6 wurde bereits gezeigt, dass die Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531 viele Zellaggregate enthielt. Dies hatte zur Folge, dass die Zahl der KBE in den einzelnen Aliquots der Zellsuspension sehr stark schwankte und der ermittelte Titer für diesen Referenzstandard insgesamt sehr niedrig war. Daraus resultierte ein sehr hohes GC/KBE-Verhältnis, was wiederrum zu der extrem hohen Nachweisgrenze für diese Zellsuspension von *M. pneumoniae,* angegeben in GC/ml, führt.

Auch die zweite Zellsuspension, die von dieser Spezies hergestellt wurde (NCTC 10119), zeigte im Vergleich mit den anderen neuen *Mollicutes*-Spezies eine geringere Nachweisgrenze in GC/ml. Auch hier war dies auf das GC/KBE-Verhältnis zurück zu führen. Dieses war mit ca.100 GC/KBE deutlich niedriger, als das der Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531, aber immer noch deutlich höher, als die der anderen neun Spezies, die alle unter 20 GC/KBE lagen. Die Ursache war auch bei dieser Zellsuspension die ca. 10fach niedrigere Wiederfindungsrate der Lebendzellzahl bei NVD in Marburg im Vergleich zur Lebendzellzahl beim Hersteller der Zellsuspension.

Tabelle 3.15: Ergebnisse der Berechnung der Nachweisgrenze für alle *Mollicutes*-Referenzstandards in GC/ml. Diese wurden sowohl basierend auf der LZZ der Eingangskontrolle, als auch basierend auf der LZZ der Stabilitätsstudie berechnet.

***Mollicutes*-Spezies**	**Eingangskontrolle**		**Stabilitätsstudie**	
	GC/KBE-Verhältnis	Nachweisgrenze (GC/ml)	GC/KBE-Verhältnis	Nachweisgrenze (GC/ml)
A. laidlawii ATCC 23206	2,3	0,9	4,7	1,9
M. gallisepticum ATCC 19610	2,2	9,9	2,7	12,2
M. hyorhinis ATCC 17981	0,3	0,4	5,1	6,1
M. pneumoniae ATCC 15531	298,5	29,9	18921,7	1892,2
M. arginini ATCC 23838	4,1	1,6	5,4	2,2
M. fermentans ATCC 19989	2,2	0,2	5,0	0,5
M. synoviae ATCC 25204	6,4	3,2	13,9	7,0
M. orale ATCC 23714	0,7	1,0	1,3	2,0
M. pneumoniae NCTC 10119	94,8	< 19	143	< 29
M. salivarium NCTC 10111	6,8	2,0	10,1	< 3,0
M. hominis NCTC 10113	2,1	1,5	3,2	2,2

3.3.2 Evaluierung der Spezifität der Methode

Die Spezifität beschreibt wie selektiv eine Methode *Mollicutes* detektiert. Werden auch andere Bakterien nachgewiesen, ist eine Methode nicht spezifisch. Da die Spezifität des CytoInspect™ Kits nur von der Sequenz der PCR-Primer und Microarray-Sonden abhängt, wurden DNA-Extrakte von sechs Bakterien-Spezies außerhalb der Klasse der *Mollicutes* hergestellt und die DNA von jeder der sechs Spezies in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 ng und 1 pg) in die PCR eingesetzt. Anschließend wurden alle PCR-Reaktionsansätze mit der Microarray-Analyse überprüft. Die Testauswertung dieser Microarray-Analysen ergab, dass keine der Bakterienarten in keiner der beiden DNA-Konzentrationen im Microarray positiv detektiert wurden. In Tabelle 3.16 wurden die „Signal-to-Noise-Ratio“ (SNR) Werte der Extraktions- und PCR-Positivkontrollen der einzelnen Tests, sowie der *Mollicutes*-Sonden angegeben. Die SNR-Werte geben die Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale auf dem Microarray an.

Bei drei der sechs Spezies handelte es sich um nahe Verwandte der *Mollicutes*, deren rDNA-Sequenz der der *Mollicutes* sehr ähnlich ist. Damit ist bei diesen Arten die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung der Primer sehr hoch. Bei den übrigen drei Spezies handelt es sich um sehr häufig bei Novartis auftretende Bakterien, bei denen die Wahrscheinlichkeit, dass sie später in einer Routineprobe enthalten sein könnten, sehr hoch ist.

Tabelle 3.16: Ergebnisse der Spezifitätsanalyse; DNA-Extrakte von sechs verschiedenen Bakterien wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen mit dem CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One getestet. Anhand der im Test integrierten Positivkontrollen wurde die Funktionalität jedes einzelnen Tests bestätigt. Angegeben sind die SNR-Werte der detektierten Fluoreszenzsignale der Extraktions- und PCR-Positivkontrolle sowie der universellen (uni.) und spezifischen (spez.) *Mollicutes*-Sonden.

Bakterien-Spezies	**Ergebnis der Microarray Analyse (SNR-Werte)**			
	1 ng/ml		1 pg/ml	
	Extraktions-/ PCR-Kontrolle	*Mollicutes* (uni./spez.)	Extraktions-/ PCR-Kontrolle	*Mollicutes* (uni./spez.)
Streptococcus pyogenes	5834/5710	0/0	4956/4125	0/0
Clostridium sporogenes	5549/6691	0/0	5468/819	0/0
Lactobacillus fermentum	5154/5708	0/0	5227/2067	0/0
Ralstonia picketii	5243/5787	0/0	5318/4155	0/0
Bacillus pumilus	6109/6219	0/0	5504/4198	0/0
Micrococcus luteus	6508/5927	0/0	5007/5593	0/0

Des Weiteren wurden die sechs verschiedenen Chargen der Rabies-Virusernte, die in der ersten Prävalidierungsstudie zur Bestimmung der Sensitivität eingesetzt wurden (siehe Tabelle 3.20), jeweils dreimal mit einem Probenvolumen von 9 ml ohne zugesetzte *Mollicutes* getestet. Gleiches wurde ebenfalls mit jeder eingesetzten Charge der FCC-Virusernte, der eibasierten Grippevirusernte „Flu eggbased“, FKS und dem NaCl-Pepton-Puffer (Stereox-Puffer) durchgeführt. Auch hier wurden keine unspezifischen Signale im Microarray gemessen.

3.3.3 Betrachtung der Robustheit

Die Robustheit einer Methode beschreibt die Unempfindlichkeit eines Tests gegenüber kleineren Veränderungen der Testparameter oder der Durchführung, die bei einer Routineanwendung auftreten können. Um festzustellen, ob das CytoInspect™ Kit robust genug ist, um validiert und in der Laborroutine zuverlässig eingesetzt zu werden, wurden die folgenden Parameter im Rahmen der Prävalidierung bei NVD in Marburg untersucht:

- Zeit (Testansätze an verschiedenen Tagen)
- Equipment (verschiedene PCR-Cycler)
- Material (mehrere Chargen der Test Kits und der Probenmatrix)
- Operator (mindestens zwei verschiedene Operatoren)

Diese Parameter wurden während der Versuche zur Bestimmung der Sensitivität der Methode im Rahmen der ersten Prävalidierungsstudie (siehe Kapitel 3.3.1) variiert. Um fest zu stellen, ob es zu Inhibitionen des Tests durch diese Paramater kam, wurden die SNR-Werte der Fluoreszenzsignale der Extraktions- und PCR-Positivkontrolle von jeder Probe zusammen gezählt. Die SNR-Werte geben die Intensität der gemessenen

Fluoreszenzsignale auf dem Microarray an. Aus allen Proben, die unter den jeweils gleichen Parametern durchgeführt wurden, wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der SNR-Werte pro Probe berechnet. In Tabelle 3.17 bis Tabelle 3.21 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Anzahl der unter den jeweiligen Parametern durchgeführten Tests ist ebenfalls angegeben. Anhand des Variationskoeffizienten (CV) wurden die Auswirkungen der verschiedenen Paramater bewertet. Dieser gibt die relative Streuung der Werte um den Mittelwert an und sollte maximal zwischen 15 und 20 % liegen.

Tabelle 3.17: Auswertung der SNR-Werte (Signal-to-Noise-Ratio) aller CytoInspect™ Tests, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Von den SNR-Werten der Kontrollen aller Proben pro Tag wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Insgesamt wurden 19 Tage ausgewertet. Die maximale Probenanzahl pro Tag beträgt 40, die Minimale sechs.

Statistische Parameter	**Versuchstage**						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Anzahl der Proben	40	30	20	10	30	30	20
Mittelwert (MW)	7049,6	11386,6	11608,6	10518,8	11648,6	11246,7	11868,2
Standardabweichung	2376,1	1697,4	1244,8	1345,3	1234,6	1407,0	1252,3
Variationskoeffizient	33,7	14,9	10,7	12,8	10,6	12,5	10,6
Statistische Parameter	**Versuchstage**						
	8	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	
Anzahl der Proben	20	30	30	20	20	30	
Mittelwert (MW)	12083,1	12585,5	10843,3	12249,1	10933,3	11250,6	
Standardabweichung	2125,4	1545,7	1773,8	1232,1	1497,5	840,8	
Variationskoeffizient	17,6	12,3	16,4	10,1	13,7	7,5	
Statistische Parameter	**Versuchstage**						
	14	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	
Anzahl der Proben	6	10	6	20	6	10	
Mittelwert (MW)	11905,7	11368,6	10796,8	11250,0	12410,7	12776,0	
Standardabweichung	1117,0	2628,3	1289,9	1637,7	625,4	454,9	
Variationskoeffizient	9,4	23,1	11,9	14,6	5,0	3,6	

Die größte Streuung der Werte wurde an den Versuchstagen 1 und 15 gemessen (siehe Tabelle 3.17). An Tag 1 wurde mit insgesamt 40 Proben die größte Probenanzahl an einem Tag innerhalb der gesamten Studie bearbeitet (pro Operator 20 Proben). An den folgenden Tagen wurden maximal 30 Proben bearbeitet Bei der Betrachtung der Werte der einzelnen Operatoren wird deutlich, dass besonders die Werte eines Operators eine sehr große Schwankung aufweisen. Die große Streuung der Werte an Versuchstag 1 ist demzufolge

weniger auf den Tag, als vielmehr auf den Operator zurück zu führen. An Tag 15 wurden insgesamt nur 5 Proben pro Operator getestet und nur ein Wert eines Operators ist deutlich niedriger als alle anderen. Da das arithmetische Mittel, welches für die Berechnung des CV zugrunde gelegt wurde, sehr anfällig für stark abweichende Werte ist und die Probenanzahl sehr gering war, hat dieser eine Wert sehr große Auswirkungen auf die Bewertung der SNR-Werte insgesamt an diesem Tag. Eine Erklärung für den niedrigen Wert der Kontrollen dieser einzelnen Probe konnte nicht gefunden werden. Die *Mollicutes* in dieser Probe wurden jedoch mit gleicher Sensitivität nachgewiesen, wie in der parallelen Probe des zweiten Operators.

Tabelle 3.18: Auswertung der SNR-Werte (Signal-to-Noise-Ratio) aller CytoInspect™ Tests, die mit vier verschiedenen „CytoInspect™ Mycoplasma Detection“ Kit-Chargen durchgeführt wurden. Von den SNR-Werten aller Proben pro Kit-Charge wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Statistische Parameter	**“CytoInspect Mycoplasma Detection” Kit-Chargen**			
	CYK 601 0009	CYK 601 1001	CYK 601 1004	CYK 101 1009
Anzahl der Proben	290,0	52,0	40,0	6,0
Mittelwert	11518,5	11720,4	7049,6	11905,7
Standardabweichung	1006,8	939,4	2768,2	523,3
Variationskoeffizient	8,7	8,0	39,3	4,4

Die Verwendung verschiedener Kit-Chargen hat zunächst scheinbar einen starken Einfluss auf die Ergebnisse des CytoInspect™ Kits. Wie in Tabelle 3.18 deutlich zu sehen ist, zeigten die SNR-Werte der Tests, die mit der jeweiligen Charge durchgeführt wurden, bei drei Kit-Chargen nur eine sehr geringe Streuung und die CV-Werte waren nahezu identisch. Eine einzelne Charge zeigte jedoch eine deutlich größere Streuung (CV = ~40). Diese Charge wurde ausschließlich an Versuchstag 1 eingesetzt. Da wie oben bereits beschrieben nur die Werte von einem Operator an diesem Tag eine starke Streuung aufweisen und die Werte des anderen Operators alleine lediglich einen CV = 15 zeigen, ist ein negativer Einfluss der Kit-Charge doch auszuschließen.

Tabelle 3.19: Auswertung der SNR-Werte (Signal-to-Noise-Ratio) aller CytoInspect™ Tests, die mit den zwei verschiedenen PCR-Cyclern durchgeführt wurden. Von den SNR-Werten aller Proben pro Cycler wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Statistische Parameter	**PCR Cycler A**	**PCR Cycler B**
Anzahl der Proben	100	288
Mittelwert	9981,6	11614,7
Standardabweichung	2611,1	1004,6
Variationskoeffizient	26,2	8,6

Auch die CV-Werte der beiden PCR-Cycler unterscheiden sich sehr deutlich voneinander (siehe Tabelle 3.19). Bei genauer Betrachtung der Daten fällt aber auf, dass Cycler A lediglich an drei der insgesamt 19 Versuchstage eingesetzt wurde und einer dieser drei Tage war erneut Versuchstag 1, was sich hier deutlich in den Werten des Cyclers A niederschlägt. Ohne die Werte dieses Versuchstags sind die SD und der CV beider Cycler nahezu identisch, so dass ein Effekt des PCR-Cyclers ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 3.20: Auswertung der SNR-Werte (Signal-to-Noise-Ratio) aller CytoInspect™ Tests, die mit insgesamt sechs verschiedenen Chargen der Rabies Virusernte durchgeführt wurden. Von den SNR-Werten aller Proben pro Charge wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Statistische Parameter	**Rabies Virusernte Chargen**					
	A	B	C	D	E	F
Anzahl der Proben	106	70	80	30	46	56
Mittelwert	10998,5	11572,5	11587,8	10843,3	11326,4	12285,8
Standardabweichung	2469,8	1026,3	613,9	1383,5	1262,3	1479,7
Variationskoeffizient	22,5	8,9	5,3	12,8	11,1	12,0

Dieser Effekt der besonders schlechten Werte an Versuchstag 1 macht sich auch bei der Betrachtung der Werte der verschiedenen Operatoren und den Chargen der Rabies Virusernte bemerkbar. Auch hier geht der große Unterschied der CV-Wert von Operator A und B sowie der Charge A und den anderen Chargen auf die Ergebnisse des ersten Tages zurück. Für die beiden verschiedenen Operatoren wurde zusätzlich zu den SNR-Werten auch die Sensitivität des *Mollicutes*-Nachweises verglichen. Dies war im Gegensatz zu den anderen Parametern hier möglich, da beide Operatoren die identischen Proben bearbeitet haben. Die Sensitivität wurde für alle acht *Mollicutes* Referenzstandards, wie bereits zuvor bei der Bestimmung der Sensitivität (siehe Kapitel 3.3.1), als Nachweisgrenze näherungsweise bestimmt. Allerdings wurden die Daten der beiden Operatoren hier getrennt voneinander ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.22 dargestellt. Sie zeigen, dass sich die Sensitivität zwischen den beiden Operatoren für den jeweiligen Referenzstandard maximal um eine Verdünnungsstufe unterscheiden.

Tabelle 3.21: Auswertung der SNR-Werte aller CytoInspect™ Tests, die von den zwei verschiedenen Operatoren durchgeführt wurden. Von den SNR-Werten aller Proben pro Operator wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Statistische Parameter	**Operator A**	**Operator B**
Anzahl der Proben	194	194
Mittelwert der SNR-Werte	11009,8	11703,8
Standardabweichung	1693,0	1122,6
Variationskoeffizient	15,4	9,6

Tabelle 3.22: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Operatoren auf die Sensitivität des *Mollicutes*-Nachweises mit dem CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One. Die Nachweisgrenze für alle acht *Mollicutes*-Referenzstandards wurde getrennt nach den zwei durchführenden Operatoren, wie in Kapitel 2.7.4 berechnet.

Stamm	**Sensitivität des *Mollicutes*-Nachweises in KBE/ml**	
	Operator A	Operator B
A. laidlawii ATCC 23206	0,7	0,1
M. gallisepticum ATCC 19610	7,3	2,4
M. hyorhinis ATCC 17981	0,3	1,9
M. pneumoniae ATCC 15531	0,1	0,06
M. arginini ATCC 23838	0,2	0,4
M. fermentans ATCC 19989	0,1	0,1
M. synoviae ATCC 25204	0,1	0,8
M. orale ATCC 23714	1,0	0,3

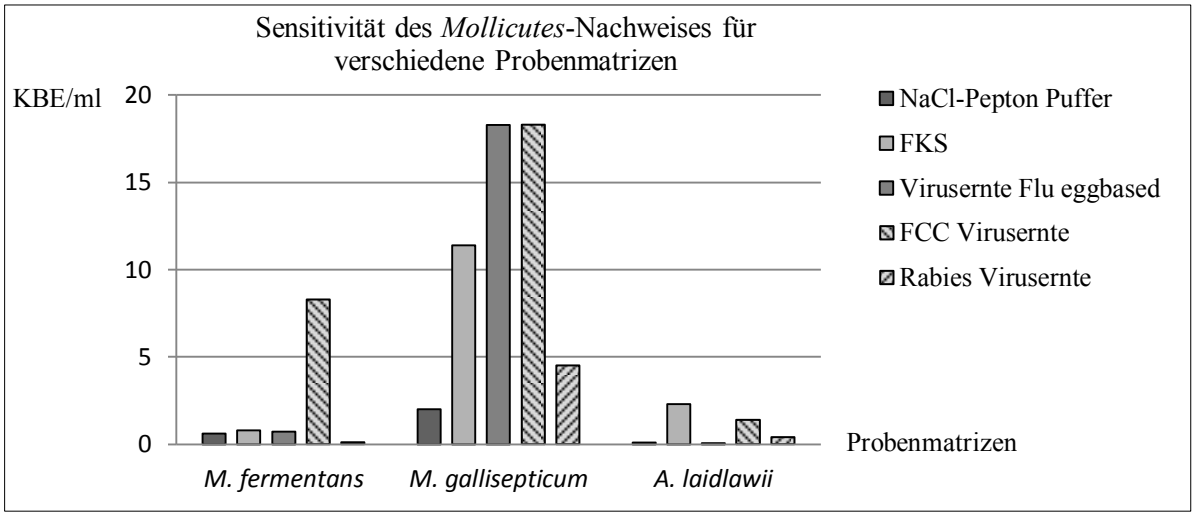
3.3.4 Analyse der Anwendbarkeit der Methode für verschiedene Probenmatrizen

Die Überprüfung, ob die Detektion von *Mollicutes* mittels CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One auch für weitere Probenmatrizen anwendbar ist, fand im Rahmen einer zweiten Prävalidierung statt. Das Ziel dieser Studie war es, eventuelle Störungen der Methode zu entdecken, die durch verschiedene Matrizen verursacht werden. Bei den Probenmatrizen, die in dieser Studie betrachtet wurden, handelt es sich um die FCC-Virusernte (Flu Cell Culture), die Virusernte „Flu eggbased“, FKS und NaCl-Pepton-Puffer (siehe Kapitel 2.2). Es wurden drei der Referenzstandards aus der ersten Prävalidierung ausgewählt: *M. gallisepticum* und *M. fermentans,* weil sie die höchste und die niedrigste Nachweisgrenze aufwiesen und *A. laidlawii*, weil das Auftreten dieser Spezies ubiquitär ist und sehr häufig als Kontamination vorkommt. Jeder dieser Stämme wurde einmal in fünf verschiedenen Konzentrationen (10 KBE/ml, 3 KBE/ml, 1 KBE/ml, 0,3 KBE/ml und 0,1 KBE/ml) mit jeder der vier verschiedenen Probenmatrizen getestet. Nach diesem Schema wurden pro Matrix 15 mit *Mollicutes* versetzte Proben mit dem CytoInspect™ Kit getestet.

In Tabelle 3.23 ist für jede Matrix die niedrigste Konzentration der drei *Mollicutes*-Spezies aufgeführt, die mit allen Proben positiv gemessen wurde. Im Vergleich der verschiedenen Probenmatrizen untereinander wird deutlich, dass die Detektion der *Mollicutes* besonders bei den Proben der Grippevirusernte „Flu eggbased“ und der FCC-Virusernte gehemmt war. Ganz deutlich zu erkennen ist auch, dass *M. gallisepticum* in allen Probenmatrizen mit der geringsten Sensitivität detektiert wurde (siehe auch Graphik 3.6). Dies wurde ebenfalls bereits in der ersten Prävalidierungsstudie festgestellt, deren Ergebnisse für die drei hier eingesetzten *Mollicutes* Referenzstandards zum Vergleich noch einmal mit angegeben wurden.

Tabelle 3.23: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion mittels CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One mit verschiedenen Probenmatrizen. Angegeben sind die niedrigsten Konzentrationen in KBE/ml der drei getesteten *Mollicutes*-Spezies, die in der jeweiligen Matrix positiv gemessen wurden. Diese entsprechen der Nachweisgrenze der Spezies in der jeweiligen Matrix

Matrix	**Sensitivität des *Mollicutes*-Nachweises in KBE/ml**		
	M. fermentans	*M. gallisepticum*	*A. laidlawii*
NaCl-Pepton Puffer	0,6	2,0	0,09
FKS	0,8	11,4	2,3
Virusernte Flu eggbased	0,7	18,3	0,07
FCC-Virusernte	8,3	18,3	1,4
Rabies-Virusernte	0,1	4,5	0,4



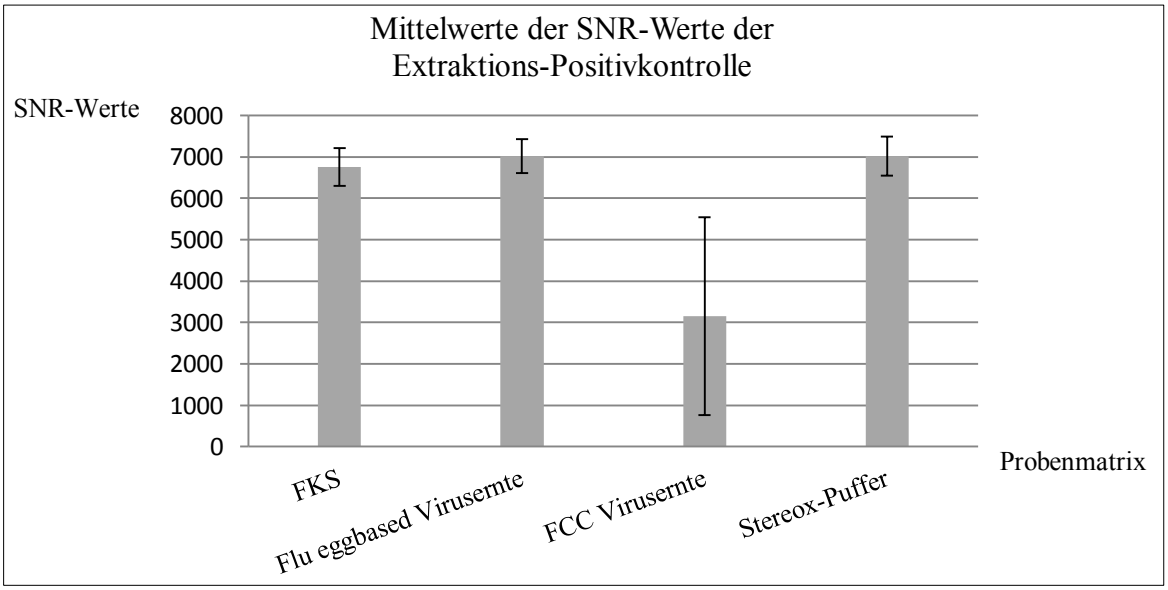
Graphik 3.6: Bestimmung der Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion mittels CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One in verschiedenen Probenmatrizen. Dargestellt sind die niedrigsten Konzentrationen der drei getesteten Spezies, die in der jeweiligen Matrix noch positiv gemessen werden konnten. Auf der X-Achse sind die drei *Mollicutes* für jede der verschiedenen Matrizen aufgelistet. Auf der Y-Achse ist die Sensitivität in KBE/ml aufgetragen.

Zusätzlich zur Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion wurde die potentielle Inhibierung der Methode durch die verschiedenen Probenmatrizen auch anhand der Extraktions- und PCR-Positivkontrollen betrachtet. Aus allen 15 SNR-Werten, die pro Matrix gemessen wurden, wurde der Mittelwert gebildet. In Tabelle 3.24 sind die Ergebnisse der Extraktions-Positivkontrolle zusammengefasst. Anhand des Variationskoeffizienten (CV) ist zu erkennen, dass die DNA-Extraktion aus der FCC-Virusernte nicht gleichmäßig funktioniert. Die Werte schwanken für diese Matrix bis zu 60 % um den Mittelwert. Im Vergleich dazu liegt der CV der anderen drei Matrizen < 7. In Graphik 3.7 sind diese Ergebnisse als Balkendiagramm +/- Standardabweichung abgebildet. Hier ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass das arithmetische Mittel der SNR-Werte für die FCC-Virusernte im Vergleich zu den anderen drei Matrizen um die Hälfte niedriger ist. Das heißt, dass die Positivkontrolle,

die vor der Extraktion zu den Proben gegebene wurde, nur in weitaus geringeren Konzentrationen aus der Probe extrahiert wurde, als dies bei den anderen Matrizen der Fall war.

Tabelle 3.24: Auswertung der Ergebnisse aus der zweiten Prävalidierungsstudie, in der die Anwendbarkeit des CytoInspect™ Kits für verschiedene Matrizen untersucht wurde. Die SNR-Werte der Extraktions-Positivkontrolle aller 15 Tests pro Matrix sind hier Zusammengefasst. Dazu wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Probenmatrix	**FKS**	**Flu eggbased Virusernte**	**FCC-Virusernte**	**Stereox-Puffer**
Mittelwert der SNR Werte der Extraktions-Positivkontrolle	6761,05	7017,41	3145,78	7014,55
Standardabweichung	455,99	412,04	2389,26	472,71
Variationskoeffizient in %	6,74	5,87	75,95	6,74

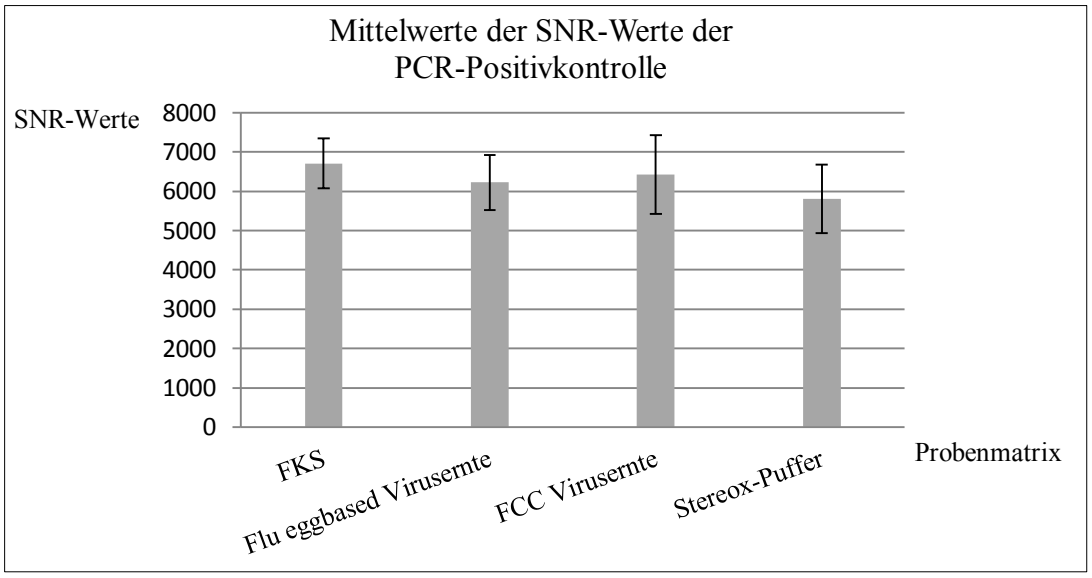


Graphik 3.7: Auswertung der SNR-Werte der Extraktions-Positivkontrolle aus der zweiten Prävalidierungsstudie, in der die Anwendbarkeit des CytoInspect™ Kits für verschiedene Matrizen untersucht wurde. Dargestellt ist das arithmetische Mittel +/- der einfachen Standardabweichung der SNR-Werte (Y-Achse) aller 15 Tests pro Matrix (X-Achse).

Auf gleiche Weise wurden auch die SNR-Werte der Fluoreszenzsignale der PCR-Positivkontrolle ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.25 zusammengefasst und in Graphik 3.8 dargestellt. Sie zeigen deutlich, dass bei keiner der verschiedenen Probenmatrizen die PCR-Reaktionen inhibiert waren. Die Mittelwerte sind alle > 5000 und auch die größte Standardabweichung von ~16 %, die bei der FCC-Virusernte gemessen wurde, deutet nicht auf eine Hemmung der PCR-Reaktion durch die Probenmatrix hin.

Tabelle 3.25: Auswertung der Ergebnisse aus der zweiten Prävalidierungsstudie, in der die Anwendbarkeit des CytoInspect™ Kits für verschiedene Matrizen untersucht wurde. Die SNR-Werte der PCR-Positivkontrolle aller 15 Tests pro Matrix sind hier Zusammengefasst. Dazu wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Probenmatrix	**FKS**	**Flu eggbased Virusernte**	**FCC-Virusernte**	**Stereox-Puffer**
Mittelwert der SNR Werte der PCR-Positivkontrolle	6703,93	6223,61	6425,08	5809,85
Standardabweichung	635,26	698,73	1000,36	866,68
Variationskoeffizient in %	9,48	11,23	15,57	14,92



Graphik 3.8: Auswertung der SNR-Werte der PCR-Positivkontrolle aus der zweiten Prävalidierungsstudie, in der die Anwendbarkeit des CytoInspect™ Kits für verschiedene Matrizen untersucht wurde. Dargestellt ist das arithmetische Mittel +/- der einfachen Standardabweichung der SNR-Werte (Y-Achse) aller 15 Tests pro Matrix (X-Achse).

Um die Ursache für die starke Hemmung der DNA-Extraktion durch die FCC-Virusernte genauer zu untersuchen, wurden die einzelnen Bestandteile der FCC-Virusernte einzeln getestet. Medium A und B werden bei der Impfstoffproduktion zur Anzucht der MDCK-Zellkultur verwendet, die dann mit den Grippeviren inokuliert wird. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Viren geerntet. Die Virusernte enthält die Medien A und B, die MDCK-Zellen sowie die Grippeviren. Von jeder dieser vier Matrizen wurden 3 × 10 ml mit dem CytoInspect™ Kit getestet und anschließend der Mittelwert aus den SNR-Werten der Extraktions- und PCR-Positivkontrollen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.26 dargestellt. Die Hemmung der DNA-Extraktion ist bei der Virusernte am deutlichsten. Der SNR-Wert der Extraktionskontrolle beträgt hier nur ein Drittel der Werte der anderen drei Probenmatrizen. Die SNR-Werte der PCR-Kontrolle sind dagegen bei allen vier Matrizen gleich.

Tabelle 3.26: Ergebnisse der Testung der einzelnen Bestandteile der FCC-Virusernte. Die beiden Medien A und B wurden zur Anzucht der MDCK-Zellkultur verwendet. Alle drei Bestandteile wurden parallel zur FCC-Virusernte mit dem CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One getestet. Von jeder Matrix wurden 3 × 10 ml Proben eingesetzt. Aus den drei SNR-Werten (Signal-to-Noise-Ratio) der Extraktions- und PCR-Positivkontrolle wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Probenmatrix	Extraktions-Positivkontrolle	PCR-Positivkontrolle
Medium A	6633	4640
Medium B	5237	4540
MDCK Zellkultur	6759	4432
FCC Virusernte	1998	5035

3.4 Messung der Nachweisgrenze des Kultivierungstests

Um die Vergleichbarkeit der bisherigen, offiziellen Verfahren mit einer PCR-basierten Methode zeigen zu können, müssen die Nachweisgrenzen aller Methoden miteinander verglichen werden. Da die Nachweisegrenze des Kultivierungstests gemäß E.P. (≤ 10 KBE/ml) niedriger ist, als die des Indikatorzelltests gemäß E.P. (≤ 100 KBE/ml), reicht es aus, die Sensitivität des Kultivierungstests mit der des PCR-basierten Tests zu vergleichen. Damit ist automatisch auch die Vergleichbarkeit mit dem Indikatorzelltest gegeben. Dem zu Folge wurde in dieser Arbeit neben der Nachweisgrenze des CytoInspect™ Kits (siehe Kapitel 3.3.1) auch die des Kultivierungstests gemessen. Dafür wurden die gleichen Referenzstandards und die gleiche Probenmatrix (Rabies Virusernte) verwendet, die auch bei der Evaluierung des PCR-basierten Tests verwendet wurden.

Die näherungsweise Bestimmung der Nachweisgrenze des Kultivierungstests erfolgte, indem drei unabhängige 10fach-Verdünnungsreihen von allen elf Referenzstandards angelegt wurden. Die Verdünnungen mit 10 KBE/ml, 1 KBE/ml und 0,1 KBE/ml wurden mit einem Probenvolumen von je 10 ml in den Kultivierungstest eingesetzt. Die Nachweisgrenze wurde als die Konzentration in KBE/ml bestimmt, bei der alle drei Tests positiv waren, d. h. die *Mollicutes* nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.27 zusammengefasst. Die Nachweisgrenze des Kultivierungstests lag bei einer Konzentration von ≤ 2 KBE/ml, was der Nachweisgrenze von *M. gallisepticum* entspricht. Dieser Stamm wurde mit der geringsten Sensitivität detektiert, *M. pneumoniae* NCTC 10119 und *M. salivarium* NCTC 10111 dagegen mit der höchsten. Bei diesen beiden Spezies wurden die *Mollicutes* in allen Proben bis zur niedrigsten Konzentration von 0,1 KBE/ml nachgewiesen. Zur Bestimmung der tatsächlichen Nachweisgrenze müssten weitere Verdünnungsstufen getestet werden, bis eine Konzentration erreicht wird, die nicht mehr in jeder Probe detektiert werden kann. Da die Nachweisgrenze der Methode insgesamt bereits bei 2 KBE/ml feststand, wurde auf die Testung weiterer Verdünnungen verzichtet.

Wegen des Einsatzes von 10 ml Probenvolumen sind auch Werte zwischen 0,1 und 1 KBE/ml realistisch. Die Nachweisgrenze ≤ 0,1 KBE/ml von *M. pneumoniae* ATCC 15531 muss kritisch betrachtet werden, da sich während der Charakterisierung der Referenzstandards gezeigt hat, dass der Titer der verwendeten Aliquots nicht stabil war, bzw. große Aggregate der Zellen in den Aliquots vorliegen. Dies kann die Bestimmung der Nachweisgrenze theoretisch positiv oder negativ beeinflussen, so dass diese mit dieser Zellsuspension nicht zuverlässig bestimmt werden kann.

Tabelle 3.27: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Sensitivität des Kultivierungstests gemäß E.P. Angegeben ist die näherungsweise bestimmte Nachweisgrenze in KBE/ml.

Spezies	**Nachweisgrenze des Kultivierungstests (KBE/ml)**
A. laidlawii ATCC 23206	0,9
M. gallisepticum ATCC 19610	1,6
M. hyorhinis ATCC 17981	0,1
M. pneumoniae ATCC 15531	< 0,1
M. arginini ATCC 23838	0,14
M. fermentans ATCC 19989	1
M. synoviae ATCC 25204	1,3
M. orale ATCC 23714	1,3
M. pneumoniae NCTC 10119	< 0,1
M. salivarium NCTC 10111	< 0,1
M. hominis NCTC 10113	1

3.5 Quantifizierung der Detektion freier, nicht zellgebundener DNA

PCR-basierte Methoden detektieren, anders als die Kultivierungstests, nicht nur die lebenden Zellen, sondern auch die DNA aus bereits abgestorbenen Zellen bzw. freie DNA. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Sensitivität des CytoInspect^{TM} Kits auch für genomische DNA gemessen, indem die Probenmatrix mit zuvor extrahierter DNA in verschiedenen Konzentrationen versetzt wurde. Bei der Durchführung dieser Methode wird bei der Lyse der Zellen die DNA der lebenden und der abgestorbenen Zellen freigesetzt. Daher sind für die Untersuchung der Sensitivität der Detektion freier DNA vor allem die Schritte von Interesse, die vor der Lyse der Zellen stattfinden, also die Zentrifugation der Zellen (4500 x g für 20 min).

Mit hohen DNA-Konzentrationen (1 ng/ml, 500 pg/ml und 1 pg/ml) in 10 ml Rabies-Virusernte Proben wurde zunächst getestet, ob DNA unter diesen Zentrifugationsbedingungen (4500 x g für 20 min) pelletiert. Die Ergebnisse zeigten, entgegen unserer Erwartung, dass in allen Tests die DNA in der Pellet-Fraktion nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse waren dadurch zu erklären, dass nach der Zentrifugation und

dem Abgießen des Überstandes neben dem Zellpellet auch jeweils ca. 100 µl des Überstands am Boden des Probengefäßes zurück blieben und ebenfalls in die Extraktion eingesetzt wurden. Unter der Annahme, dass die DNA in der Probe homogen verteilt war, enthielten diese 100 µl bei den hohen Konzentrationen, die hier getestet wurden, auch ohne Zentrifugation einen Teil der DNA.

Im nächsten Schritt wurde daher die Nachweisgrenze der Methode für freie, genomische DNA bei einem Probenvolumen von 10 ml gemessen. Es wurden DNA-Konzentrationen bis 1 fg/ml getestet. Um Matrix-spezifische Effekte, z. B. durch die Adhäsion der DNA an Bestandteile der Matrix, zu verhindern, legte man diese Proben mit PCR-Wasser an, statt mit der Rabies-Virusernte. Die Ergebnisse (siehe Tabelle 3.28, Ansatz A) zeigen, dass bis zu 50 fg/ml bei einem Probenvolumen von 10 ml positiv detektiert wurden. Diese Konzentration entsprach einer absoluten DNA-Menge von 5 fg in den 100 µl Überstand, die nach der Zentrifugation über dem Zellpellet zurückblieben.

Tabelle 3.28: Untersuchung der Sensitivität der Detektion freier, genomischer DNA mit dem CytoInspect™ Kit. PCR-Wasser wurde als Probenmatrix mit genomischer DNA von *A. laidlawii* versetzt und in verschiedenen Konzentrationen in die Test eingesetzt. Bei Ansatz A wurden 10 ml Proben zentrifugiert und die am Boden des Probengefäßes verbleibenden 100 µl des Überstandes in die Extraktion eingesetzt. Bei Ansatz B wurden direkt nur 100 µl der Proben ohne vorherige Zentrifugation in die Extraktion eingesetzt.

DNA-Konzentration	**Anzahl der positiv getesteten Probe/Anzahl der eingesetzten Proben**	
	Ansatz A (10 ml Proben)	**Ansatz B** (0,1 ml Proben)
1 ng/ml	2/2	Nicht durchgeführt
500 pg/ml	4/4	Nicht durchgeführt
1 pg/ml	4/4	Nicht durchgeführt
500 fg/ml	2/2	**2/2**
100 fg/ml	2/2	0/2
50 fg/ml	**2/2**	0/2
10 fg/ml	1/4	0/2
5 fg/ml	0/2	0/2
1 fg/ml	1/2	0/2

Abschließend sollte verifiziert werden, ob die Zentrifugation tatsächlich keinen Einfluss auf die Nachweisgrenze der freien, genomischen DNA hat. Dazu wurde die Nachweisgrenze des CytoInspect™ Kits erneut mit nur 100 µl der DNA-Verdünnungen gemessen, statt wie zuvor mit 10 ml. Die Proben wurden bei diesen Tests ohne Zentrifugation direkt in die DNA-Extraktion eingesetzt. Die Ergebnisse (siehe Tabelle 3.28 Ansatz B) zeigten, dass die niedrigste Konzentration, bei der alle Tests positiv waren 500 fg/ml betrug, was einer absoluten DNA-Menge von 50 fg in den 100 µl entsprach. Ohne Zentrifugation lag die

Nachweisgrenze für freie, genomische DNA also bei einer 10fach höheren DNA-Konzentration (500 fg/ml), als mit Zentrifugation (50 fg/ml). Das bedeutet, durch die Zentrifugation bei 4500 × g für 20 Minuten wurde die DNA in den restlichen 100 µl der Probe, die nach dem Abgießen des Überstands am Boden des Probengefäße zurück blieben, angereichert.

3.6 Analysen zur Bewertung der Testsicherheit

3.6.1 Betrachtung des Risikos für falsch-positive Ergebnisse

Die Prüfung auf Abwesenheit von *Mollicutes* dient dem Zweck bereits vorhandene Kontaminationen in den Produktionsproben zu entdecken. Kommt es während der Durchführung dieser Tests in der Qualitätskontrolle zur Kontamination der Proben von außen, würde dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Um das Risiko, mit dem ein solcher Fall eintritt, besser abschätzen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Risikoanalyse erstellt. Zunächst identifizierte man alle potentiellen, primären Quellen aus denen *Mollicutes*-Kontaminationen stammen können, wie z. B. der Operator. Anschließend erweiterte man die Analyse auf alle sekundären Quellen, durch die die primären Kontaminationen weiterverbreitet werden könnten. Im nächsten Schritt wurde dann eruiert welche der Risiken, durch die in den betreffenden Laboren vorhandenen Maßnahmen, z. B. in Bezug auf Hygiene oder bauliche Vorkehrungen, bereits abgedeckt und minimiert sind. Darüber hinaus wurden zusätzliche Maßnahmen definiert, bzw. einige der vorhandenen Maßnahmen genauer reguliert, um die zusätzlichen Risiken abzudecken, die durch die Etablierung einer PCR-basierten Methode zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* zur Chargenfreigabe entstehen. Die Ergebnisse der Risikoanalyse wurden in Tabelle 3.29 zusammengefasst. Hier wurden alle *Mollicutes*-Quellen markiert, auf die die jeweilige Maßnahme einen Effekt hat und so dazu beiträgt, das Risiko zur Weiterverbreitung der Kontaminationen ausgehend von dieser Quelle, zu minimieren. In Tabelle 3.30 sind alle Maßnahmen kurz beschrieben. Einige der Maßnahmen haben nur auf einzelne Quellen einen Effekt, während andere auf sehr breiter Ebene zur Minimierung des Kontaminationsrisikos beitragen. Besonders effektiv sind die Maßnahmen XIV - XVII, die die Verbreitung von Kontaminationen auf den Oberflächen der Arbeitsumgebung verhindern sollen. Außerdem hat die strikte Trennung der einzelnen Arbeitsabschnitte sowie der jeweils verwendeten Materialien und Geräten (siehe Maßnahme III und IV) Einfluss auf viele potentielle Risiken. Ebenso die Maßnahmen VII und VIII, die dazu beitragen den Eintrag von Verschmutzungen in die Laborbereiche zu verringern.

Tabelle 3.29: Zusammenfassung der Risikoanalyse für falsch-positive Testergebnisse: es wurden insgesamt vier primäre Quellen für *Mollicutes* identifiziert und 12 sekundäre Quellen, über die die Kontaminationen weiter verbreitet werden können. Für diese potentiellen Quellen wurden 17 einzelne Maßnahmen zusammengestellt, die in fünf Gruppen zusammengefasst und sortiert wurden. Die Maßnahmen sind im Detail in Tabelle 3.30 beschrieben.

Frage: Für welche der genannten *Mollicutes*-Quellen kann das jeweilige Risiko zur Weiterverbreitung der Kontaminationen durch die genannten Maßnahmen minimiert werden?		**Potentielle Quellen von Kontaminationen**															
		Primär				**sekundär**											
Risiko	**Maßnahmen***	**Operator**	**Lösungen/Puffer**	**Arbeitsmaterialien**	**Kontaminierte Proben**	**Allgemeine Arbeitsumgebung**	**Arbeitsflächen**	**Puffergefäße (außen)**	**Geräteoberflächen**	**Probengefäßständer**	**Pipetten & Pipettierhilfen**	**Boxen der Pipettenspitzen (außen)**	**Stifte**	**Arbeitshilfen (Protokolle)**	**Handschuhe**	**Arbeitskittel & Schutzbrillen**	**Pinzetten, Scheren**
Kontamination der Proben durch die Arbeitsumgebung	I					X											
	II					X											
	III						X	X	X	X	X	X	X				X
	IV						X	X	X	X	X	X	X				X
	V	X			X	X										X	
	VI**	X	X		X												
	VII	X				X	X		X				X			X	
Kontamination der Proben durch den Operator	VIII	X				X	X		X				X	X	X	X	
	IX**	X															
Kontamination der Proben durch kontaminierte Puffer, Lösungen und andere Materialien	X		X	X													
Kreuzkontamination der Proben/geöffneten Puffer durch kontaminierte Proben	XI**	X	X		X												
	XII				X												
	XIII				X												
Verbreitung von Kontaminationen auf den Oberflächen der Arbeitsumgebung	XIV**	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	XV**	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	XVI						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	XVII**						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* Die hier aufgezählten Maßnahmen sind im Detail in der folgenden Tabelle 3.30 beschrieben.
** Diese Maßnahmen wurden im Rahmen der Etablierung des PCR-basierten *Mollicutes*-Nachweisverfahrens zusätzlich zu den bereits vorhandenen implementiert bzw. strenger oder genauer reguliert.

Tabelle 3.30: Beschreibung der Maßnahmen, die im Rahmen der Risikoanalyse bei der Etablierung des PCR-basierten Nachweisverfahrens für *Mollicutes* als notwendig definiert wurden, um das Risikos für falsch-positive Testergebnisse zu minimieren.

Nr.	Maßnahmen
I	Kontrolle der Raumluft: Definierter Luftwechsel und Filtration der Raumluft minimieren die Partikel- und Keimbelastung der Arbeitsumgebung
II	Reinigung und Desinfektion der Räumlichkeiten: Regelmäßige Reinigung der Böden, Türen, Wände, Schränke usw. (gemäß Hygieneplan)
III	Räumliche Trennung der folgenden Arbeitsschritte: Probenvorbereitung, DNA-Extraktion, Herstellen des PCR-Reaktionsmix, Zugabe der DNA-Extrakte, Detektion der PCR-Produkte
IV	Festlegung des Verwendungszwecks von Geräten: Ausstattung von jedem Arbeitsplatz z.B. mit einem eigenen Pipettensatz, Zuordnung von Zentrifugen, usw.
V	Nutzung von Sicherheitswerkbänken: Verkleinerung der Arbeitsumgebung ermöglicht effektivere Gegenmaßnahmen im Kontaminationsfall, Barriere zwischen dem Operator und der allgemeinen Arbeitsumgebung und den Proben
VI*	Unkontrollierte Luftverwirbelungen und Zugluft vermeiden: Zugang zu den betreffenden Räumen beschränken, Keine schnellen Bewegungen
VII	Kleidungswechsel: Straßenkleidung und Arbeitskleidung gemäß Hygieneplan trennen, Kittelwechsel beim Wechsel des Arbeitsplatzes von DNA-Extraktion zu PCR
VIII	Hygienemaßnahmen: Regelmäßiges Händewaschen und Desinfizieren gemäß Hygieneplan, (mindestens vor Beginn und nach Abschluss der Arbeiten)
IX*	Vermeiden von Aerosolen: Tragen von OP-Masken über Mund und Nase
X*	Sterilität und DNA-Freiheit (*Mollicutes*-DNA) gewährleisten: Qualitätskontrollen und Zertifizierung durch den Hersteller; Überprüfung der Maßnahmen im Rahmen der Eingangskontrolle
XI*	Offene Gefäße vermeiden: Puffergefäße nicht offen stehen lassen, zügig schließen, nie mehrere Proben parallel öffnen
XII	Anordnung der Arbeitsmaterialien am Arbeitsplatz: kurze Wege mit benutzen Pipetten ohne Proben-/Puffergefäße zu überkreuzen; Entfernen aller nicht benötigten Materialien, Abstand zwischen Operator und Proben
XIII	Verwendung von Einfachverbrauchsmaterial: Pipettenspitzen NIE mehrfach nutzen, Reaktionsgefäße nicht reinigen, autoklavieren und wiederverwenden
XIV*	Handschuhwechsel: Wechsel der Handschuhe nach jedem Arbeitsschritt
XV*	Unnötige Berührungen vermeiden, strikte Trennung nach: **"sauber"** Berührung nur mit Handschuhen und **"nicht sauber"** Berührung nie mit Handschuhen
XVI	Reinigung/ Desinfektion der Oberflächen und Geräte: Verschmutzungen entfernen und lebende Kontaminationen abtöten, um die Effektivität der folgenden Dekontamination zu erhöhen (gemäß Hygieneplan)
XVII*	Dekontamination: Beseitigen von DNA-Spuren durch DNA-zerstörende Agenzien

* Diese Maßnahmen wurden im Rahmen der Etablierung des PCR-basierten *Mollicutes*-Nachweisverfahrens zusätzlich zu den bereits vorhandenen implementiert bzw. strenger oder genauer reguliert.

3.6.2 Betrachtung des Risikos für falsch-negative Ergebnisse

Ebenso wie das Risiko für falsch-positive Ergebnisse besteht auch ein Risiko für falsch-negative Ergebnisse, das heißt vorhandene Kontaminationen bleiben unentdeckt weil die *Mollicutes* oder ihre DNA während der Probenbearbeitung verloren gehen. Mit Blick auf potentielle Schritte, die ein solches Risiko mit sich bringen können, wurde die Durchführung des *Mollicutes*-Nachweises erneut betrachtet. Im Folgenden werden alle Punkte, die bei dieser Bewertung aufgefallen sind und näher untersucht wurden, beschrieben.

Repräsentative Probenvolumina

Das Probenvolumen ist ein wichtiger Faktor, der die Wahrscheinlichkeit mit der eine Kontamination entdeckt wird, maßgeblich beeinflusst. Das Probenvolumen für den Kultivierungstest und das CytoInspect™ Kit beträgt 10 ml. Ob dieses Probenvolumen repräsentativ ist, hängt von dem Volumen der Produktstufe zum Zeitpunkt der Entnahme der 10 ml Probe für den *Mollicutes*-Test ab. Um dies zu untersuchen wurde die folgende Berechnung durchgeführt: Aus der Virusernte einer Charge mit einem Volumen von 100 l wird eine 10 ml Probe entnommen. Folgende Annahme wird getroffen: ein Zielmolekül (z. B. KBE oder GC) in einer Probe reicht für einen positiven Nachweis aus und die Zielmoleküle sind homogen in der Probe verteilt. Die Frage ist dann: wie viele Zielmoleküle müssen in der gesamten Virusernte enthalten sein, damit mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, ein Molekül in der Probe von 10 ml enthalten ist? Die folgende Formel wurde für diese Berechnung verwendet:

$$n = log_p (1-P)$$

- n = Anzahl der Zielmoleküle in der Probe;
  - p = ((V_{Charge} - 10 ml) / V_{Charge}) und V_{Charge} = das Chargenvolumen in ml
  - P = 0,95

Daraus ergibt sich, dass für das oben genannte Beispiel 29956 Zielmoleküle (z. B. KBE oder GC) in den 100 L Virusernte enthalten sein müssen. Das entspricht einer Konzentration von ca. 0,3 Zielmolekülen/ml. Mit steigendem Volumen steigt auch die notwendige Konzentration der Zielmoleküle linear an. Das heißt bei einem Volumen von 1000 L müssten 3 Zielmoleküle/ml enthalten sein, bei 2500 L 7,5. Diese Konzentrationen sind sehr gering, sodass 10 ml Probenvolumen auch bei großen Chargenvolumina repräsentativ sind.

Zentrifugation der Probe

Zu Beginn der Durchführung des CytoInspect™ Kits werden 10 ml Proben zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen. Lediglich das Pellet und ein Rest von ca. 100 µl bleibt zurück und wird in die DNA-Extraktion eingesetzt. Erst nach diesem Schritt wird die Extraktions-Positivkontrolle zu den Proben gegeben. An dieser Stelle besteht die Möglichkeit, dass die *Mollicutes*-Zellen nicht vollständig pelletiert werden und zum Teil mit dem Überstand aus der Probe entfernt werden.

Um dies zu überprüfen wurden die Überstände verschiedener Proben in den Kultivierungstest eingesetzt. Bei einer unvollständigen Zentrifugation der Zellen, würden einige im Überstand verbleiben, die dann mit dem Kultivierungstest nachgewiesen werden können. Zunächst wurden verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten (1500 × g, 2500 × g, 3500 × g und 4500 × g) in Bezug auf ihre Effektivität bei der Pelletierung von *Mollicutes*-Zellen getestet. Alle Proben enthielten die gleiche Konzentration von *A. laidlawii* (100 KBE/ml). Die Ergebnisse zeigten, dass in den Überständen aller Proben *Mollicutes* enthalten waren, die mit dem Kultivierungstest nachgewiesen werden konnten. Das heißt die Zentrifugation bei 4500 × g für 20 min reicht nicht aus für eine 100 %ige Ernte der Zellen.

Um festzustellen wie viele *Mollicutes*-Zellen in einer Probe enthalten sein müssen, damit im Überstand einige zurückbleiben und mit dem Kultivierungstest nachgewiesen werden können, wurden im nächsten Schritt verschiedene *Mollicutes*-Konzentrationen bei gleichbleibender Zentrifugationsgeschwindigkeit getestet. Neben den Überständen, die man mit dem Kultivierungstest kontrollierte, wurden bei diesem Versuch auch die Pellets mit dem CytoInspect^{TM} Kit auf *Mollicutes* überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.31 zusammengefasst. Zu sehen ist, dass sowohl im Überstand als auch im Pellet *A. laidlawii* bis zu einer Konzentration von 1 KBE/ml detektiert wurde. Diese Konzentration entspricht insgesamt 10 Zellen in 10 ml Probe. Da bereits eine Zelle im Überstand oder im Pellet ausreicht, um ein positives Ergebnis zu erhalten, könnten theoretisch zwischen 10 und 90 % der Zellen pelletiert worden sein.

Tabelle 3.31: Ergebnisse zur Untersuchung der Effektivität der initialen Zentrifugation der *Mollicutes*-haltigen Proben bei 4500 × g für 20 Minuten. Nach der Zentrifugation wurden die *Mollicutes* im Überstand mittels Kultivierungstest nachgewiesen, während die *Mollicutes* im Pellet mit dem CytoInspect^{TM} Kit detektiert wurden.

Konzentration (KBE/ml)	**Ergebnisse der *Mollicutes*-Detektion**	
	Überstand (Kultivierungstest)	Pellet (CytoInspect^{TM} Kit)
100	Positiv	Positiv
10	Positiv	Positiv
1	Positiv	Positiv
0,1	Negativ	Negativ
0,01	Negativ	Negativ

Um heraus zu finden wie viel Prozent der *Mollicutes*-Zellen in einer 10 ml Probe bei 4500 × g für 20 Minuten pelletiert werden und ob sich dieser prozentuale Anteil verändert, wenn verschiedene Zellkonzentrationen getestet werden, führte man den folgenden Versuch durch: eine 10fach-Verdünnungsreihe von 10^5 bis 10^2 KBE/ml von *A. laidlawii* wurde angelegt und zentrifugiert. Die Pellets resuspendierte man in 1 ml Medium. Anschließend wurde der Titer (KBE/ml) im Überstand und in dem resuspendierten Pellet durch Kultivierung auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.32 zusammengefasst.

Tabelle 3.32: Ergebnisse zur Quantifizierung der Zellzahlen im Überstand und dem Pellet einer 10 ml Probe nach der Zentrifugation bei 4500 × g für 20 Minuten. Vier 10 ml Proben mit verschiedenen Konzentrationen von *A. laidlawii* wurden zentrifugiert und anschließend die Zellzahl im Überstand und im Pellet durch Kultivierung auf Agarplatten bestimmt. Die Konzentration der Proben vor der Zentrifugation wurde ebenfalls bestimmt. Die Wiederfindungsrate wurde ausgehend von der Zellzahl vor der Zentrifugation berechnet. Der jeweilige Prozentanteil der Zellen in den Pellets und Überständen wurde ausgehend von den nach der Zentrifugation insgesamt wiedergefundenen Zellen berechnet.

Nominelle Zellzahl pro Probe (100 %)	**Wiederfindungsrate in %**	**Ergebnisse der Titerkontrolle**			
		Überstand		**Pellet**	
		KBE/ml	Prozentanteil	KBE/ml	Prozentanteil
7×10^5	155	$1{,}8 \times 10^5$	17	$9{,}1 \times 10^5$	83
7×10^4	256	$1{,}9 \times 10^4$	11	$1{,}6 \times 10^5$	89
7×10^3	241	$1{,}4 \times 10^3$	8	$1{,}6 \times 10^4$	92
7×10^2	66	69	15	$3{,}9 \times 10^2$	85

Lediglich bei der kleinsten Konzentration kam es zu deutlichen Zellverlusten. Die hohen Wiederfindungsraten der anderen Proben ist vermutlich auf stärker vereinzelte Zellen durch das Resuspendieren während der Titerkontrolle zurück zu führen. Insgesamt ist der prozentuale Anteil der Zellen im Pellet und im Überstand bei allen vier Konzentrationen sehr ähnlich. Lediglich bei der kleinsten Konzentration wurden insgesamt nur ca. 60 % der Zellen aus der originalen Probe wiedergefunden. Die Ergebnisse der Untersuchung der initialen Zentrifugation zeigten, dass 80 bis 90 % der *Mollicutes*-Zellen in einer 10 ml Probe bei 4500 × g für 20 min pelletiert wurden, unabhängig von der Konzentration der Zellen in der originalen Probe.

Verluste während der Durchführung des „CytoInspect™ Mycoplasma Detection“ Kits

Während der DNA Extraktion kann an en vielen Stellen zu Verlusten der *Mollicutes* bzw. Ihrer DNA kommen. Z. B. kann es durch DNasen in den Proben es zum Abbau der zu untersuchenden DNA kommen. Dies wird jedoch verhindert durch die Zugabe von EDTA in den Puffern zur Lyse der Zellen. Die Silicamembran in den Säulchen der DNA-Extraktion bindet die DNA über Ionische Bindungen der negativ geladenen DNA und der positiv geladenen Oberfläche der Silicamembran. Verluste der DNA können sowohl bei der Bindung an die Säule auftreten, als auch beim Eluieren, wenn die DNA wieder von der Säule gelöst werden soll. Auch bei der PCR kann es z.B. durch Verunreinigungen im DNA-Extrakt zu Verlusten in der Sensitivität kommen. Diese Effekte können aber nicht direkt quantifiziert werden, sondern nur mit Hilfe der Extraktions- und PCR-Positivkontrollen überwacht werden. Sollte es bei diesen Schritten zu Verlusten oder Inhibitionen kommen, sollten auch die Kontrollen entsprechend schlechter oder gar nicht detektierbar sein.

Lediglich beim Herstellen des PCR-Reaktionsansatzes erfolgt eine messbare Reduzierung der Anzahl der DNA-Moleküle, die detektiert werden können Von den 50 µl des DNA-Extrakts werden nur 10 µl als Template in die PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. An dieser Stelle wird also

nur ein Fünftel der Probe untersucht, der Rest geht nicht weiter in die Testung mit ein. Nach der PCR werden nur 13 µl von insgesamt 50 µl PCR-Ansatz mit dem Microarray hybridisiert. Bei einer positiven PCR liegt jedoch genug Amplifikat vor, so dass auch ein Viertel des gesamten Ansatzes ausreicht um mit dem Microarray detektiert zu werden.

4 Diskussion

Mollicutes kommen parasitisch oder kommensal in nahezu allen Lebewesen dieser Erde vor. Sie sind außerdem häufige Kontaminationen von Zellkulturen, da sie wegen ihrer geringen Zellgröße und der fehlenden Zellwand nicht durch Sterilfiltration entfernt werden können. Zudem ist die Behandlung mit Antibiotika durch den stark reduzierten, eigenen Stoffwechsel sowie die intrazelluläre Lokalisation der *Mollicutes* schwierig und häufig erfolglos. Die Auswirkungen solcher Kontaminationen auf die Wirtszellen sind vielfältig und reichen von Nährstoffmangel über Veränderungen des Stoffwechsels bis hin zum Absterben der Kultur (Siehe auch Kapitel 1.1 und 1.2). Bei der zellkulturbasierten Herstellung von pharmazeutischen Produkten können *Mollicutes*-Kontaminationen einen starken, negativen Effekt auf die Qualität und die Sicherheit der Produkte für den Patienten haben. Aus diesem Grund ist die Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* bei der Herstellung von zellkulturbasierten Impfstoffen durch die Behörden wie die EMA und FDA vorgeschrieben. Bisher gibt es zwei Methoden, die für diesen Zweck zugelassen und in den Arzneibüchern (z.B. Europäische Pharmakopoeia E.P., United States Pharmakopoeia USP) beschrieben sind. Beide basieren auf der Kultivierung der *Mollicutes* mit künstlichen Nährmedien und Zellkulturen. Die Testdauer beträgt dabei 10 bis 28 Tage und es können nur solche *Mollicutes* detektiert werden, die sich unter diesen Bedingungen vermehren können. Die Auswertung der Tests bedarf außerdem einer großen Erfahrung des Operators. Besonders für Produkte mit sehr kurzen Haltbarkeitszeiten und für In-Prozess -Kontrollen sind diese Methoden unzureichend. Seit 2007 sind, laut E.P. und USP, molekularbiologische Methoden auf PCR-Basis für die Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* zugelassen. Voraussetzung ist, dass die Ergebnisse mit den bisherigen Methoden vergleichbar oder besser sind. (Siehe auch Kapitel 1.3)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine PCR-basierte Methode zum Nachweis der Abwesenheit von *Mollicutes* in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle der Firma Novartis Vaccines & Diagnostics (NVD) am Standort Marburg etabliert. Die folgenden Kernpunkte wurden zu diesem Zweck bearbeitet und werden im Folgenden diskutiert:

1. Die Auswahl einer geeigneten Methode
2. Die Etablierung von *Mollicutes*-Referenzstandards
3. Die Evaluierung der Detektion von *Mollicutes* (Nachweisgrenze, Vergleich mit dem Kultivierungstest, Detektion freier DNA)
4. Die Evaluierung der Spezifität und Robustheit der Methode
5. Die Bewertung der Testsicherheit (Risiko für falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse)

Damit wurden die Grundlagen für die anstehende Validierung des Verfahrens gelegt, mit der nachgewiesen und dokumentiert wird, dass das Verfahren mit angemessen großer Sicherheit reproduzierbare Ergebnisse bei der Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* liefert.

4.1 Die Auswahl einer geeignete Methode

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst die am besten geeignete, PCR-basierte Methode für die Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* ausgewählt. Die folgenden drei „ready-to-use“ Test-Kits, die laut dem jeweiligen Hersteller alle *Mollicutes* mit einer Sensitivität ≤ 10 KBE/ml nachweisen konnten, wurden dazu miteinander verglichen:

- das MycoTOOL™ PCR *Mycoplasma* Detection Kit der Fa. Roche Diagnostics GmbH,
- die Kombination des PrepSEQ™ *Mycoplasma* Nucleic Acid Extraction Kit mit dem MycoSEQ™ *Mycoplasma* Real-Time PCR Detection Kit der Fa. Life Technologies und
- das System der Fa. Greiner Bio-One, bestehend aus dem CytoInspect™ *Mycoplasma* DNA Extraction Kit und dem CytoInspect™ *Mycoplasma* Detection Kit.

Um die bisherigen, klassischen Methoden durch ein solches Verfahren ersetzten zu können, muss die Sensitivität eines solchen Tests, gemäß E.P., ≤ 10 KBE/ml sein (EDQM, 2011). Der direkte, praktische Vergleich der Sensitivität wurde mit der FCC-Virusernte als Probenmatrix durchgeführt. Das Besondere an dieser mit Grippeviren infizierten MDCK-Zellkultur war, dass es sich um eine Suspensionszelle handelte, deren Zellen nicht am Boden der Kulturgefäße adhärierten (siehe Kapitel 2.3). Dadurch enthielt das Probenmaterial Zellzahlen ≥ 10^7 Zellen/ml sowie eine hohe Grippevirenkonzentration. Diese Matrix stellte somit die größte Herausforderung für PCR-basierte Methoden dar, da die DNA der *Mollicutes* aus einer großen Menge zellulärer und viraler Bestandteile extrahiert werden musste.

Der Vergleich der Sensitivität wurde mit einem Probenvolumen von 1 ml und drei verschiedenen Konzentrationen (3 KBE/ml, 10 KBE/ml und 100 KBE/ml), die jeweils dreimal mit jeder Methode gemessen wurden, durchgeführt. Es zeigte sich, dass das CytoInspect™ Kit als einzige Methode alle acht getesteten *Mollicutes*-Spezies bis zur kleinsten Konzentration detektieren konnte. Die beiden anderen Methoden erreichten diese Sensitivität nur bei sechs (MicroSEQ™ Kit) bzw. sieben (MycoTOOL™ Kit) der insgesamt acht Spezies. Mit dem MycoTool™ Kit konnten, bis zu einer Konzentration von 10 KBE/ml, alle Spezies nachgewiesen werden. Die Anforderung der E.P. an die Sensitivität einer PCR-basierten Methode wurde demnach auch mit dieser Methode erfüllt. Das MycoSEQ™ System benötigte ein Probenvolumen von mindestens 4 ml, um alle acht *Mollicutes* mit einer Sensitivität von 10 KBE/ml zu detektieren. Durch das größere Probenvolumen kam es jedoch zu inhibitorischen Effekten bei der PCR-Reaktion, sodass einige Tests nicht auswertbar waren. Im bisherigen, klassischen Kultivierungstest werden 10 ml der Proben eingesetzt. Der Einsatz dieses Probenvolumens bietet eine einfache Möglichkeit die Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion zu erhöhen und so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der klassischen und der neuen Methoden zu gewährleisten. Der Einsatz von 10 ml der FCC-Virusernte gelang ausschließlich mit dem CytoInspect™ Kit. Obwohl die große Menge der zellulären Bestandteile die Silicamembran-Säulen verstopfte, war die Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion unverändert niedrig. Bei dem Einsatz von 10 ml

Proben in dem MycoSEQ™-System stieg die Zahl der nicht auswertbaren Tests, durch die Hemmung der PCR-Reaktionen, auf 50 %. Das MycoTool™ Kit erlaubte maximal die Testung von 1 ml Probenvolumina.

Bei einer Prüfung im Rahmen der Qualitätskontrolle eines Produkts mit dem Ziel der Chargenfreigabe bedeutet ein nicht auswertbarer Test, dass kein Ergebnis für diese Prüfung vorliegt. Wenn weiteres Probenmaterial zur Verfügung steht kann der Tests wiederholt werden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass es erneut zu einem nicht auswertbaren Test kommt. In diesem Fall kann die Chargenfreigabe nur dann erfolgen, wenn durch meist zeit- und kostenintensive Untersuchungen die Unbedenklichkeit dieser Charge bewiesen werden kann. Aus diesem Grund war die Anwendbarkeit der Methode auch für 10 ml Probenvolumen eine wichtige Voraussetzunge für die Auswahl der am besten geeigneten Methode.

Spezifität bedeutet bei einer Methode zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes*, dass ausschließlich diese Bakterien detektiert werden. Um dies zu untersuchen wurden mit jeder Methode sechs verschiedene Bakterienarten, die nicht aus der Klasse der *Mollicutes* stammten, je dreimal mit 10^3 KBE/ml in 1 ml NaCl-Pepton Puffer getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die spezifische Detektion von *Mollicutes* nur bei zwei der drei Kits gegeben war, dem CytoInspect™ Kit und dem MycoSEQ™ System. Mit dem MycoTool™ Kit wurden hingegen drei der sechs Bakterienarten in den Proben nachgewiesen. Zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* müsste bei dieser Methode das PCR-Produkt sequenziert werden, um im Fall eines positiven Ergebnisses das Vorhandensein dieser Bakterien eindeutig als Ursache zu bestätigen. Zudem fand die Detektion der PCR-Produkte bei diesem Verfahren mittels Gelelektrophorese statt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten wie leicht es dabei zu Kreuzkontaminationen der Proben untereinander kommen kann. Die Positivkontrolle *A. laidlawii* führte zu einer Bande, also einem positiven Ergebnis, in der benachbarten Spur einer Bakterienprobe. Durch eine Wiederholung der Gelelektrophorese konnte dies als Ursache für die positiven Signale bestätigt werden. Bei einer Routinetestung auf Abwesenheit führt jedoch jedes positive Signal automatisch zu einer umfangreichen Ursachenanalyse, die mindestens eine verzögerte Produktfreigabe nach sich zieht, die aber auch dazu führen kann, dass die betroffene Charge verworfen wird. Im extremen Fall kann es zum Produktionsstillstand kommen. Die Wiederholung der Testung reicht hierbei nicht aus, um die Ursache des positiven Signals zu erklären.

Neben der Sensitivität und der Spezifität ist die Implementierung von geeigneten Positivkontrollen eine der wichtigsten Anforderungen der E.P. an PCR-basierte Methode zur Detektion von *Mollicutes***.** Diese sollen dazu dienen, Hemmungen des Tests in den einzelnen Proben zu entdecken, die zu einer verminderten Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion führen könnten. Diesen Zweck erfüllten die interne und externe Positivkontrolle des CytoInspect™ Systems am besten. Bei beiden Kontrollen handelte es sich um Plasmide, die zu Beginn der Extraktion (interne) und beim Ansetzen der PCR-Reaktion (externe) zu jeder einzelnen Probe gegeben wurden. Parallel zu der *Mollicutes*-DNA wurden beide Kontrollen mit den gleichen Primern während der PCR amplifiziert und mit einer eigenen Sonde auf dem Microarray detektiert. Lediglich der erste Zentrifugationsschritt zum Pelletieren der zellulären Bestandteile der Proben wird durch diese Kontrollen nicht überwacht. Bei den beiden anderen Methoden wurden die Kontrollen als eigene Tests

parallel zu den Proben mitgeführt. Bei dem MycoSEQ™ System wurde zudem die interne Positivkontrolle erst nach der Isolation der *Mollicutes*-Zellen aus den Proben zugegeben, sodass mehrere Zentrifugationsschritte noch vor Beginn der eigentlichen DNA-Extraktion nicht überwacht werden konnten.

Das CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One bot zusätzlich den Vorteil, dass durch die Anwendung des Microarrays 39 *Mollicutes* auf Spezies-Ebene identifiziert werden können. Diese umfassen 95 % der häufigsten, bisher aufgetretenen Zellkulturkontaminationen. Diese Identifizierung ist möglich, da die Sonden auf dem Microarray an die ITS-Sequenz der *Mollicutes* binden. Diese Spacer-Sequenz weist im Gegensatz zu den ribosomalen Genen große Variationen auf, anhand derer die einzelnen *Mollicutes*-Spezies unterschieden werden können (Volokhov, et al., 2006). So bietet dieses Verfahren ein ideales Werkzeug, um im Fall eines positiven Ergebnisses, direkt die Ursachenanalyse durchzuführen, schnell Gegenmaßnahmen einzuleiten und zügig die Wiederaufnahme der Produktion zu gewährleisten.

Das CytoInspect™ System der Fa. Greiner Bio-One wurde als das am besten geeignete Kit zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* ausgewählt. Tabelle 4.1 gibt noch einmal einen Überblick über die verschiedenen Auswahlkriterien und die jeweilige Bewertung der drei miteinander verglichenen „ready to use“ Kits.

Tabelle 4.1: Bewertungsmatrix der drei „ready to use“ Kits zur Detektion von *Mollicutes*. Jedes Kit bekam pro Bewertungsparameter 1 (schlecht) bis 3 (sehr gut) Punkte. Für die Gesamtbewertung wurden die Punkte pro Kit zusammen gezählt. Da die Quantifizierung der DNA mit dem MycoSEQ™ Kit der Fa. Life Technologies nur bei der Validierung der Methode, nicht aber bei der Routineprüfung auf Abwesenheit einen Vorteil bietet, wurde die nur mit 2 Punkten bewertet. Die beste Bewertung mit insgesamt 14 Punkten bekam das CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One.

Bewertungsparameter	**MycoTOOL™** (Roche)	**MycoSEQ™** (Life Technologies)	**CytoInspect™** (Greiner Bio-One)
Sensitivität	2	1	3
Spezifität	1	3	3
Positivkontrollen	1	2	3
10 ml Proben einsetzbar	1	1	2
Besondere Vorteile	Nein (1)	Quantifizierung der DNA mittel Realtime-PCR (2)	Direkte Identifizierung von 40 versch. *Mollicutes* (3)
Gesamtbewertung	**6**	**9**	**14**

4.2 Etablierung von *Mollicutes*-Referenzstandards

Die grundlegendste Voraussetzung und Anforderung der Behörden für die Etablierung einer PCR-basierten Methode zur Prüfung der Abwesenheit von *Mollicutes* ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden klassischen mit dem neuen Testverfahren (FDA, 2011; EDQM, 2011). Die bisherigen Methoden basieren auf der Detektion von koloniebildenden Einheiten (KBE). Die neue, PCR-basierte Methode detektiert dagegen DNA. Um die Ergebnisse beider Methoden miteinander vergleichen zu können, mussten geeignete

Referenzstandards eingesetzt werden, deren Konzentration der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) und der Genkopien der rRNA-Sequenz (GC/ml) bekannt sind.

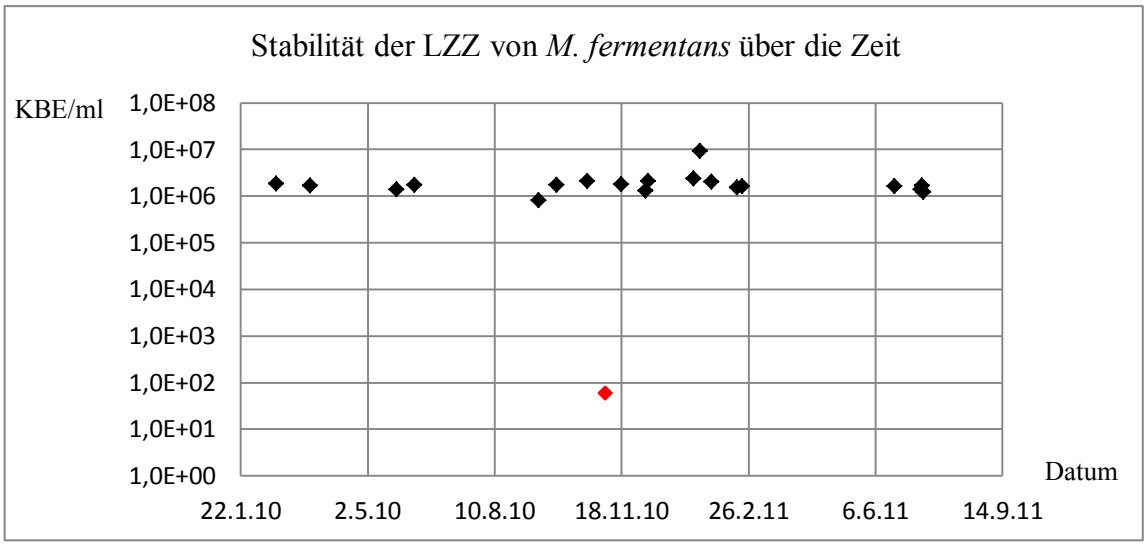
In dieser Arbeit wurden zehn *Mollicutes*-Referenzstandards etabliert, die diese beiden Kriterien erfüllten. Dazu wurden Zellsuspensionen der einzelnen Spezies hergestellt und als Aliquots (je 500 × 1 ml) tiefgefroren gelagert (siehe Kapitel 2.4.1). Die Charakterisierung dieser Zellsuspensionen als Referenzstandards wird in den folgenden zwei Kapiteln diskutiert. Die Auswahl der zehn Spezies beruhte auf den Vorgaben der E.P. sowie des Technical Reports No. 50 der PDA (Parental Drug Association) und repräsentieren ca. 95 % der häufigsten Zellkulturkontaminationen, die durch *Mollicutes* verursacht wurden und in den letzten Jahrzehnten weltweit gefunden wurden (EDQM, 2011; PDA, 2010). Zudem handelt es sich um einige der häufigsten, pathogenen Erreger dieser Klasse, die bei Menschen und Tieren vorkommen (Blanchard & Bébéar, 2002; Razin, 2006). Diese Auswahl deckte weiterhin alle potentiellen Quellen für *Mollicutes* in der zellkultur- und eibasierten Impfstoffproduktion bei NVD in Marburg ab (siehe Kapitel 3.2.1). Nicht eingeschlossen waren pflanzliche *Mollicutes* und solche, die bei Insekten vorkommen, denn bisher werden keine Rohstoffe oder Zellkulturen aus diesen beiden Quellen eingesetzt. Sollten in der Zukunft auch pflanzliche Rohstoffe, wie z. B. Pepton aus Soja, für die zellkulturbasierte Impfstoffproduktion verwendet werden, müssen auch diese Spezies Berücksichtigung finden. Dann sollte z. B. *Spiroplasma citrii* zusätzlich als Referenzstandard etabliert werden.

4.2.1 Bewertung der Lebendzellzahlen der *Mollicutes*-Referenzstandards

Um für die Bestimmung von Nachweisgrenzen Proben mit einer definierten Konzentration der koloniebildenden Einheiten (KBE) einsetzten zu können und um für alle Referenzstandards ein repräsentatives GC/KBE-Verhältnis bestimmen zu können, wurden die KBE der einzelnen Standards genau charakterisiert. Das wichtigste Kriterium dabei war die Stabilität des Titers (KBE/ml) in den Aliquots der Zellsuspensionen der jeweiligen Spezies. Von allen Zellsuspensionen wurden alle Aliquots (ca. 15 – 20), die im Zeitraum von ca. 1 bis 2 Jahren verwendet wurden, betrachtet und die Titerschwankungen um den Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse dieser Stabilitätsstudie zeigten, dass die Mittelwerte der KBE/ml der einzelnen Zellsuspensionen sehr repräsentativ für die einzelnen Aliquots waren (Standardabweichung < 0,5) und die Titer nur in einem sehr geringen Bereich um diesen Mittelwert schwankten (siehe Kapitel 3.2.4).

Bei vier der insgesamt zehn Spezies wurden bei einzelnen Aliquots stark abweichende Werte gemessen. Bei diesen lag der Titer deutlich, d. h. mehr als zwei Log-Stufen, von dem Mittelwert entfernt. Dennoch waren die Titer der Zellsuspensionen insgesamt sehr stabil was am Beispiel von *M. fermentans* zu sehen ist. Bei diesem Referenzstandard lag die Standardabweichung ohne den einzelnen, abweichenden Wert (siehe Graphik 4.1, roter Punkt) bei 0,2 im Vergleich zu der Standardabweichung von 1,02 mit diesem Wert. Die Ursache für diese Abweichung konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Möglicherweise handelte es sich um abweichende KBE-Zahlen, aber auch Verdünnungsfehler beim Anlegen der Verdünnungsreihen konnten nicht ausgeschlossen werden. Die Auswirkungen solcher stark abweichenden Titer auf die

Bestimmung der Nachweisgrenze einer Methode können erheblich sein, aber nicht auszuschließen. Daher wurde eine Kontrolle zur Überprüfung der Richtigkeit jeder Verdünnungsreihe festgelegt, bei der eine Titerkontrolle an der Verdünnung mit nominell 100 KBE/ml durchgeführt wurde. Als Spezifikation für die Richtigkeit wurde der Faktor +/- 2 definiert. Das heißt, der gemessene Titer musste zwischen 50 und 200 KBE/ml liegen, andernfalls wurden alle Tests, die mit dieser Verdünnungsreihe erfolgten, wiederholt.



Graphik 4.1: Dargestellt sind die einzelnen Titer der Zellsuspensionen von *M. fermentans* (Y-Achse), die in der Zeit von 2010 bis 2011 (X-Achse) gemessen wurden. Der Mittelwert des LZZ ist $1{,}5 \times 10^6$ KBE/ml mit einer Standardabweichung von 1,02. Ohne den Ausreißer (rot) am 05.11.2010 liegt die SD bei 0,2.

Die einzige Zellsuspension ohne einen stabilen Titer war die von *M. pneumoniae* ATCC 15531. Hier konnte kein repräsentativer Mittelwert bestimmt werden, da die Titer der einzelnen Aliquots zwischen Null und 10^5 KBE/ml schwankten (siehe Kapitel 3.2.4). Als Ursache dafür wurde eine starke Aggregatbildung vermutet. Dies konnte durch verschiedene Versuche bestätigt werden. So wurde die homogene Verteilung der KBE in den einzelnen Aliquots untersucht, indem dreimal das komplette Volumen eines Aliquots von je 1 ml zu je zehnmal 100 µl ausplattiert wurde. Die Anzahl der KBE auf den Agarplatten unterschied sich um den Faktor 10 und mehr (siehe Kapitel 3.2.5). Das wiederrum bedeutet, dass in den Aliquots Zellaggregate enthalten waren, deren Zellzahl sich ebenfalls um mehr als den Faktor 10 voneinander unterschieden. Um die Aggregatgröße noch genauer zu quantifizieren wurde eine FACS-Analyse mit dieser Zellsuspension durchgeführt.

Bei der **FACS-Analyse** wurde sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die Zahl der abgestorbenen Zellen bestimmt. Aus der Differenz der beiden wurde die Zahl der intakten, lebenden Zellen berechnet (siehe Kapitel 2.6.4). Diese Lebendzellzahl ist aber nicht direkt zu vergleichen mit dem Titer, der durch Kultivierung gemessen wurde. Der Grund ist, dass die Unterscheidung der lebenden von den abgestorbenen

Zellen bei der FACS-Analyse auf dem intakten Zustand der Zellmembran der Zellen basiert. Jedoch ist nicht jede Zelle deren Membran noch intakt ist auch zwangsläufig vermehrungsfähig und bildet eine Kolonie aus.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse mit der Zellsuspension von *M. pneumoniae* ATCC 15531 ergaben, dass $2{,}3 \times 10^7$ intakte Zellen/ml in den Aliquots enthalten waren. Verglichen mit den KBE/ml bedeutet das, dass nur 0,03 % der intakten Zellen eine Kolonie ausbildeten (siehe Tabelle 4.2). Berücksichtigt man, dass bei dieser Zellsuspension der Titer durch den Einfrierprozess der Aliquots bereits um eine Log-Stufe gesunken war (siehe Kapitel 3.2.2), entsprach dieses Ergebnis immer noch einer Aggregatgröße von mehreren 100 – 1000 Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die Zellsuspension von *A. laidlawii* bei der FACS-Analyse eine Lebendzellzahl von $1{,}4 \times 10^7$ Zellen, von denen 60 % eine Kolonie ausbildeten. Der Anteil der nicht vermehrungsfähigen oder in Aggregaten gebundenen Zellen war hier bedeutend kleiner.

Tabelle 4.2: Vergleich der Ergebnisse der Lebendzellzahlen (LZZ) von *A. laidlawii* und *M. pneumoniae,* bestimmt mittels Titerkontrolle (Kultivierung) und FACS-Analyse.

Spezies	**LZZ** (Kultivierung)	**LZZ** (FACS-Analyse)	**% der KBE bildenden Zellen**
A. laidlawii ATCC 23206	$8{,}6 \times 10^6$	$1{,}4 \times 10^7$	60
M. pneumoniae ATCC 15531	$6{,}23 \times 10^3$	$2{,}3 \times 10^7$	0,03

Die starke **Neigung von *M. pneumoniae* zur Aggregat- und Biofilmbildung** wurde bereits mehrfach beschrieben. *M. pneumoniae* kann in Flüssigkulturen ganze Netzstrukturen aus filamentartigen Zellen bilden und Zellberge am Boden der Kulturgefäße auftürmen. Dies kann zu mehrschichtigen und weitläufigen Gebilden, sogenannten Biofilmen, führen (Biberfeld & Biberfeld, 1970; Kornspan, et al., 2011; McAuliffe, et al., 2006). Wird diese spezielle Eigenschaft dieser Spezies bei der Herstellung von Zellsuspensionen nicht berücksichtigt, bleibt es nicht aus, dass diese eine große Anzahl von Aggregaten enthalten. Die Einstellung eines stabilen Titers ist so nicht möglich. Aus diesem Grund wurde für diese Spezies eine neue Zellsuspension hergestellt (*M. pneumoniae*, NCTC 10119), deren Mittelwert bei $1{,}7 \times 10^5$ KBE/ml lag und mit einer Standardabweichung von 0,3 repräsentativ für die einzelnen Aliquots war. Bei den beiden *M. pneumoniae* Stämmen ATCC 15531 und NCTC 10119 handelt es sich um den gleichen Typ-Stamm dieser Spezies.

4.2.2 Die Bewertung des GC/KBE-Verhältnisses der *Mollicutes*-Referenzstandards

Ein niedriges GC/KBE-Verhältnis der Referenzstandards ist für die Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR-basierten Methode sehr wichtig. Nur so kann der schlechteste Fall simuliert werden, der bei der Detektion der *Mollicutes* in der späteren Routine eintreten kann. Dieser entspricht der geringstmöglichen DNA-Konzentration, die im Fall einer Kontamination theoretisch vorliegen kann, also einem GC/KBE-Verhältnis von 1. Außerdem würde bei einem sehr hohen GC/KBE-Verhältnis die Sensitivität der PCR-

basierten Methode überschätzt und es wäre keine echte Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der Kultivierungsmethoden gegeben.

Mit dem CytoInspect™ System, wird die Spacer-Region zwischen der 16S rRNA- und der 23S rRNA-Sequenz, die sogenannte „Intergenic Transcribed Spacer" Region (ITS), amplifiziert (Greiner Bio-One, 2010). Normalerweise tragen Bakterien vielfache Kopien des ribosomalen Operons in ihrem Genom (Kang, et al., 2010). Nicht so die *Mollicutes*, die aufgrund ihrer Genomreduktion die ribosomalen Gene in der Regel nur ein bis zweimal enthalten (Amikam, et al., 1984; Chen & Finch, 1989; Liu, et al., 2010; Rechnitzer, et al., 2010). Die Anzahl der Genomkopien/ml in den Aliquots der zehn *Mollicutes*-Zellsuspensionen wurden dreifach bestimmt, indem mit Hilfe der Threshold-Methode die DNA/ml quantifiziert und daraus, anhand der bekannten Genomgrößen, die Zahl der Genome/ml berechnet wurden. Da *Mollicutes*-Genome nur eine bzw. zwei Kopien des ribosomalen Gene-Clusters enthalten, wurde die Anzahl der Genome mit der Anzahl der rRNA-Genkopien gleichgesetzt. Die Genkopien der Zellsuspensionen (GC/ml) wurden mit den bei Novartis gemessen KBE/ml ins Verhältnis gesetzt, sodass man die Genkopien pro koloniebildender Einheit (GC/KBE) in den einzelnen Aliquots erhielt. Die Ergebnisse zeigten, dass bis auf die Zellsuspensionen von *M. pneumoniae* (GC/KBE = > 100) und *M. synoviae* (GC/KBE = 14), alle Referenzstandards ein niedriges GC/KBE-Verhältnis von ≤ 10 aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.7).

Wenn eine *Mollicutes*-Zelle einer bzw. zwei rRNA-Genkopie/n entspricht ist das Verhältnis der rRNA-Genkopien pro KBE in der jeweiligen Zellsuspension abhängig vom Verhältnis der lebenden zu den abgestorbenen Zellen, bzw. der Anzahl der Zellen (lebend und tot) pro KBE. Das bedeutet um ein möglichst geringes Verhältnis von Genkopien pro KBE zu erhalten, müssen möglichst wenig tote Zellen in den Zellsuspensionen enthalten sein und die einzelnen koloniebildenden Einheiten aus möglichst wenigen Zellen bestehen.

Um die Zahl der abgestorbenen Zellen zu reduzieren müssen die Zellsuspensionen in der richtigen Wachstumsphase geerntet werden. In einer Studie der CBER aus dem Jahr 2011 wurde die Veränderung des GC/KBE-Verhältnisses während der Wachstumskurve verschiedener *Mycoplasma* mittels Realtime-PCR untersucht. (Debrazhynetskaya, et al., 2011). Die Ergebnisse zeigten, dass die GC/KBE-Verhältnisse bis zur frühen stationären Wachstumsphase sehr niedrig waren. Im Laufe der stationären Phase und der Sterbephase stieg dieses Verhältnis, aufgrund der sinkenden Zahl der KBE, stark an. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten am Beispiel von *M. orale* und *A. laidlawii* ebenfalls, dass das GC/KBE-Verhältnis in der mittleren bis späten, exponentiellen Wachstumsphase am niedrigsten ist. *M. orale* enthielt in dieser Phase ca. 10 GC/KBE, *A. laidlawii* ca. 50 - 100 GC/KBE (siehe Kapitel 3.2.8). Zu Beginn der exponentiellen Phase jedoch, stieg die Zahl der Genomkopien pro KBE zunächst stark an und sank erst gegen Mitte der exponentiellen Phase wieder ab. Der optimale Erntezeitpunkt liegt daher nach der frühen exponentiellen und vor der stationären Wachstumsphase. Von den zehn Referenzstandards, die in dieser Arbeit etabliert wurden zeigte *M. synoviae* mit 14 GC/KBE, neben *M. pneumoniae*, das größte GC/KBE-Verhältnis. Diese Zellsuspension wurde bereits gleich zu Beginn der exponentiellen Phase geerntet, was die Ursache für die

höhere Zahl der Genomkopien sein könnte. Allerdings wurde auch *M. arginini* gleich zu Beginn seiner exponentiellen Phase geerntet und dieser enthält lediglich 5 GC/KBE. Das bedeutet, auch innerhalb der exponentiellen Phase ist der optimale Erntezeitpunkt bei den einzelnen Spezies verschieden. Generell können hohe GC/KBE-Verhältnisse aber verhindert werden indem die Zellsuspensionen vor der stationären Wachstumsphase geerntet werden.

Ein weiterer Punkt der beachtet werden sollte, um die Zahl der abgestorbenen Zellen zu reduzieren ist die Überlebensrate beim Einfrieren bzw. Auftauen der Aliquots. Neben kryoprotektiven Substanzen, die Zellschäden vermindern sollen, und der jeweils optimalen Geschwindigkeit bei der die Zellen eingefroren und aufgetaut werden, ist die Konzentration der Zellen zum Zeitpunkt des Einfrierens der Aliquots entscheidend. Je größer die Konzentration der Zellen, umso geringer ist der prozentuale Anteil der absterbenden Zellen (Raccach, et al., 1975). Die Überlebensraten der elf Zellsuspensionen in dieser Arbeit lagen zwischen 35 und 115 % (siehe Kapitel 3.2.2). Das bedeutet im Fall der niedrigsten Überlebensrate von 35 % ist die Zahl der toten Zellen und damit auch der Genomkopien maximal um den Faktor 2 – 3 größer als die Anzahl der KBE.

Die Anzahl der Zellen pro KBE kann von dem jeweiligen Zellteilungsverhalten beeinflusst werden. Für die meisten *Mollicutes* ist bisher die binäre Teilung beschrieben worden (Furness, et al., 1976; Bernstein-Ziy, 1969; Miyata, 2002). Von den zehn in dieser Arbeit verwendeten Spezies wurde lediglich bei *M. hominis* ein anderer Mechanismus beobachtet. Dem zu Folge entstehen vor der Teilung der Zellen zunächst lange Filamente mit mehreren Genomkopien, von denen dann die einzelnen Tochterzellen abgetrennt werden (Bredth, et al., 1973). Da *M. hominis* aber ein sehr geringes GC/KBE-Verhältnis von 3 aufwies (siehe Kapitel 3.2.7), hat auch dieses Teilungsverhalten hier keinen negativen Einfluss.

Den größten Einfluss auf das Verhältnis der Zellen pro KBE und damit auch auf die Anzahl der Genkopien pro KBE hat die spezifische Neigung der jeweiligen Spezies zur Aggregatbildung. Je mehr Aggregate in einer Zellsuspension enthalten sind, umso höher ist die Zahl der Zellen pro KBE. Hinzu kommt, dass je unterschiedlicher die Größe der Aggregate ist, umso stärker schwanken die Titer der einzelnen Aliquots. Bei *M. pneumoniae* ATCC 15531 hatte dies zu Folge, dass die Wiederfindung der KBE/ml, das heißt der Mittelwert der Titer, mit der Zeit von über 10^3 KBE/ml auf unter 100 KBE/ml abgesunken ist (siehe Kapitel 3.2.4). Zusammen mit der geringen Überlebensrate von 35 % (siehe Kapitel 3.2.2) war dies der Grund für das extrem hohe GC/KBE-Verhältnis von knapp 20.000 in dieser Zellsuspension.

Die niedrige Wiederfindungsrate von ca. 12 % (siehe Kapitel 3.2.4) war auch bei der zweiten Zellsuspension von *M. pneumoniae* (NCTC 10119) der Grund für das hohe GC/KBE-Verhältnis von ca. 150. Allerdings enthielt diese deutlich weniger bzw. keine Aggregate, so dass der Mittelwert des Titers mit einer Standardabweichung von 0,3 sehr stabil war (siehe Kapitel 3.2.4). Verschiedenste Parameter zur Verbesserung der Wiederfindungsrate dieses Standards, wie das Erhöhen der Luftfeuchtigkeit in den Inkubatoren, das Volumen der angelegten Verdünnungen, die Größe der einzelnen Verdünnungsschritte und Inokulieren der Agarplatten ohne Spatel, wurden im Rahmen dieser Arbeit bisher ohne Erfolg getestet. Ein

Faktor der einen Einfluss haben könnte und noch untersucht werden soll, ist die Lagerungstemperatur der tiefgefrorenen Aliquots. Beim Hersteller der Zellsuspension werden diese bei < - 60 °C gelagert, bei NVD in Marburg dagegen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff (ca. - 140°C). Bisher sind nur wenige Daten zur Stabilität der *Mollicutes* bei der Lagerung in flüssigem Stickstoff (- 150 °C bis - 196 °C) bekannt, diese zeigen aber keinen negativen Effekt auf die Überlebensrate (Norman, et al., 1970). Die Lagerung der *Mollicutes* bei – 20 °C bis – 70 °C wurde dagegen häufiger untersucht. Alle diese Studien zeigen, dass die Überlebensrate, besonders über einen längeren Zeitraum, bei – 70 °C höher ist als bei - 20 °C (Raccach, et al., 1975; Furr & Taylor-Robinson, 1990; Addey, et al., 1969).

4.3 Evaluierung der Detektion von *Mollicutes*

4.3.1 Bestimmung der Nachweisgrenze des CytoInspect™ Kits

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Implementierung und Zulassung einer PCR-basierten Methode zur Detektion von *Mollicutes*, mit der die bisherigen, offiziellen Methoden ersetzt werden können, ist eine gleichwertige Sensitivität des Nachweises. Die E.P. gibt als Richtwert für die Nachweisgrenze PCR-basierter Methoden ≤ 100 KBE/ml an, wenn der Indikatorzelltest ersetzt werden soll und ≤ 10 KBE/ml, wenn der Kultivierungstest ersetzt werden soll (EDQM, 2011).

In dieser Arbeit wurde daher, zunächst mit der Rabies-Virusernte, die Nachweisgrenze des CytoInspect™ Kits mit den zehn, in dieser Arbeit etablierten Referenzstandards gemessen. Bei der Rabies-Virusernte handelte es sich um den Kulturüberstand einer primären Zellkultur von Hühnerembryonen, die mit einem attenuierten Tollwutvirus infiziert wurde. Es wurden jeweils 10 ml Proben in drei oder sechs Wiederholungen gemessen, um die Nachweisgrenzen zu bestimmen (siehe Kapitel 3.3.1). Diese lagen für die zehn Referenzstandards zwischen 0,1 und 5 KBE/ml. Die niedrigste Sensitivität wurde mit *M. gallisepticum* (4,5 KBE/ml) gemessen. Durch den Einsatz des Probenvolumes von 10 ml, konnten auch Nachweisgrenzen <1 KBE/ml bestimmt werden, da in einer 10 ml Probe mit einer Konzentration von 0,1 KBE/ml insgesamt zwischen zehn und einer KBE enthalten sind. Je nach Spezies reichen diese bereits aus, um ein positives Ergebnis zu erzeugen. Die Anforderungen der E.P. an die Sensitivität einer PCR-basierten Methode, mit der beide klassischen Tests ersetzt werden können, wurden damit erfüllt.

Die Nachweisgrenze des CytoInspect™ Systems in GC/ml wurde ausgehend von der Nachweisgrenze in KBE/ml, unter Berücksichtigung des jeweiligen GC/KBE-Verhältnisses der *Mollicutes*-Referenzstandards, berechnet. Mit Ausnahme von *M. pneumoniae* lagen die Nachweisgrenzen zwischen 0,5 und 12 GC/ml. Die einzige Ausnahme stellte *M. pneumoniae* dar. Trotz des hohen GC/KBE-Verhältnisses von ca. 150 wurde eine Nachweisgrenze von < 30 GC/ml bestimmt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die kleinste Konzentration, bei der dieser Referenzstandard getestet wurde bei 0,1 KBE/ml lag und alle Tests bis zu dieser Konzentration positiv waren. Das heißt die Nachweisgrenze für diese Spezies liegt unterhalb von 0,1 KBE/ml. Bei der späteren Validierung der Nachweisgrenze wird bis zur niedrigsten, noch detektierbaren

Konzentration getestet. Das heißt, man kann davon ausgehen, dass für diesen Referenzstandard eine noch niedrigere Nachweisgrenze in GC/ml erreicht werden kann.

Von den zehn Referenzstandards, die bei diesen Tests zum Einsatz kamen, tragen die vier Spezies *M. fermentans, M. hominis*, *M. synoviae* (Rechnitzer, et al., 2010) und *A. laidlawii* (Volokov, et al., 2007) zwei Kopien der 16S - 23S Intergenic Spacer Region. Bei diesen ist die Nachweisgrenze in Genkopien/ml tatsächlich doppelt so hoch wie zunächst angegeben. Während dadurch bei *M. synoviae* die Nachweisgrenze auf 26 GC/ml ansteigt, bleibt die der anderen drei weiterhin bei ≤ 10 GC/ml.

4.3.2 Vergleich der Sensitivität mit dem Kultivierungstest

Die Nachweisgrenze des Kultivierungstests wurde in dieser Arbeit ebenfalls in einem dreifachen Ansatz für die Rabies-Virusernte bestimmt. Auch hier liegen die Werte für die geringste, detektierbare Konzentration der einzelnen Spezies zwischen 0,1 und ~ 2 KBE/ml. Die geringste Sensitivität wurde ebenfalls bei *M. gallisepticum* (1,9 KBE/ml) gemessen (siehe Kapitel 3.4). Damit liegt die Nachweisgrenze dieses Tests ebenfalls unterhalb von 10 KBE/ml und ist vergleichbar mit der Sensitivität des PCR-basierten CytoInspect™ Kits (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen des Kultivierungstests gemäß E.P. und des CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One. Für beide Verfahren wurde die praktisch bestimmte Nachweisgrenze in KBE/ml angegeben. Für das PCR-basierte Testverfahren wurde zusätzlich auch die Nachweisgrenze in GC/ml berechnet.

Stamm	**Nachweisgrenzen**		
	Kultivierungstest	**CytoInspect™ Kit**	
	KBE/ml	KBE/ml	GC/ml
A. laidlawii ATCC 23206	0,9	0,4	1,9
M. gallisepticum ATCC 19610	1,6	4,5	12,2
M. hyorhinis ATCC 17981	0,1	1,2	6,1
M. pneumoniae ATCC 15531	< 0,1	0,1	18921,2
M. arginini ATCC 23838	0,14	0,4	2,2
M. fermentans ATCC 19989	1	0,1	0,5
M. synoviae ATCC 25204	1,3	0,5	7,0
M. orale ATCC 23714	1,3	1,5	2,0
M. pneumoniae NCTC 10119	< 0,1	< 0,2	< 29
M. salivarium NCTC 10111	< 0,1	< 0,3	< 3,0
M. hominis NCTC 10113	1	0,7	2,2

Bei dem Vergleich der PCR-basierten Detektion von *Mollicutes* mit den klassischen, kultivierungsbasierten Methoden muss auch bedacht werden, dass mit dem Kultivierungstest nicht alle *Mollicutes*-Spezies detektiert

werden können, da nicht alle auf künstlichen Medien wachsen. Aus diesem Grund wird in der bisherigen Testroutine bei NVD in Marburg bei der Prüfung der Saatviren und Saatzellen, anders als bei den Virusernten, zusätzlich der Indikatorzelltest eingesetzt. Durch die Verwendung von Zellkulturen bei dieser Methode wird die Bandbreite der detektierbaren Spezies deutlich erweitert. Die Nachweisgrenze dieser Methode ist jedoch ca. 10fach geringer als die des Kultivierungstests. Der Vorteil der neuen, PCR-basierten Methode liegt darin, dass alle *Mollicutes* ohne Verlust der Sensitivität detektiert werden. Somit besteht die Möglichkeit beide bisherigen Methoden mit dem CytoInspect™ Kit zu ersetzten.

4.3.3 Anwendbarkeit des CytoInspect™ Systems für weitere Produkte

Die bisherigen beschriebenen Experimente zur Bestimmung der Sensitivität wurden ausschließlich mit der Rabies-Virusernte durchgeführt. Neben diesem Produkt werden bei Novartis Vaccines & Diagnostics noch weitere Impfstoffe produziert, deren Herstellung auf Zellkulturen oder Hühnereiern basiert. Auch bei diesen wird während der Produktion die Abwesenheit von *Mollicutes* überprüft, sodass das neue, PCR-basierte Nachweisverfahren auch für diese Produkte implementiert werden soll. Aus diesem Grund wurde die Eignung des CytoInspect™ Kits für die FCC-Virusernte und die Virusernte aus der Eibasierten Grippeimpfstoffproduktion (Allantoisflüssigkeit) überprüft. Zusätzlich wurde Fötales Kälberserum (FKS, Rohstoff für die Medienherstellung) und NaCl-Pepton-Puffer getestet. Letzterer wurde in dieser Arbeit zum Anlegen der *Mollicutes*-Verdünnungsreihen verwendet. Der Puffer diente als Kontrolle, da er weniger Substanzen enthielt, die die PCR-Reaktionen inhibieren können, wie z.B. zelluläre DNA und RNA der eukaryotischen Zellkulturen. Indem die Ergebnisse des Puffers mit denen der komplexen Probenmatrizen verglichen wurden, konnten inhibitorische Effekte erkannt werden. Als Parameter zur Bewertung der Matrixeffekte wurden die Fluoreszenzsignale der Extraktions- und PCR-Positivkontrollen auf den Microarrays betrachtet. Zusätzlich wurde die Sensitivität des CytoInspect™ Kits für die hier beschriebenen Produkte, Rohstoffe und Puffer beispielhaft mit drei verschiedenen Referenzstandards, untersucht (siehe Kapitel 3.3.4).

Die Ergebnisse zeigten, dass die PCR-Reaktion durch keine der Probenmatrizen negativ beeinflusst wurde (siehe Kapitel 3.3.4, Tabelle 3.25). Die Extraktion der *Mollicutes*-DNA und der Extraktionskontrolle (Plasmid-DNA) aus den FCC-Virusernte Proben war dagegen stark gehemmt. Dies war an den im Mittel deutlich niedrigeren und stark schwankenden SNR-Werten der Fluoreszenzsignale der Kontrolle zu erkennen (siehe Kapitel 3.3.4, Tabelle 3.24). Dadurch war auch die Sensitivität des *Mollicutes*-Nachweises bei der FCC-Virusernte im Vergleich zum NaCl-Pepton Puffer und der Rabies-Virusernte verringert. Die Konzentrationen, bei denen die *Mollicutes* noch positiv detektiert wurden, waren bei dieser Matrix bis zu 10fach höher (siehe Kapitel 3.3.4, Tabelle 3.23Tabelle 3.27). Trotz der deutlichen Inhibition des Tests durch die FCC-Virusernte lag die geringste, gemessene Nachweisgrenze bei ca. 18 KBE/ml. Das bedeutet die Sensitivität der *Mollicutes*-Detektion war noch immer sehr niedrig.

Die Ergebnisse der Test mit den einzelnen Komponenten der FCC-Virusernte zeigten weiterhin, dass im Gegensatz zur Virusernte, die Medien und auch die Zellkultur vor der Virusinfektion die Extraktion der DNA nicht störten (siehe Kapitel 3.3.4, Tabelle 3.26). Vergleiche der Zellpellets der Virusernte und der Zellkultur nach der Zentrifugation der 10 ml Proben bei 4500 × g für 20 Minuten haben ergeben, dass sich die Mengen der zellulären Bestandteile der Beiden nicht maßgeblich voneinander unterscheiden. Trotzdem war bei beiden zu beobachten, dass die Säulen bei der Extraktion verstopften. Dies führte jedoch nur bei der Virusernte zu Verlusten der DNA, was an den schwachen Fluoreszenzsignalen der Extraktions-Positivkontrolle zu erkennen war (siehe Kapitel 3.3.4, Tabelle 3.26). Die Menge des zellulären Materials war daher vermutlich nicht ausschlaggebend für die starke Inhibition der Extraktion durch die FCC-Virusernte, sondern die Grippeviren. Da es sich bei dem Influenzavirus um einen RNA-Virus handelt (Priore, et al., 2012), ist es möglich, dass die RNA-und Proteinkonzentration in der Virusernte deutlich höher ist, als in der reinen Zellkultur. Eine weitere Optimierung der Lyse des zellulären Materials durch die RNase- und Proteinase könnte daher zu einer Verbesserung der *Mollicutes*-Detektion in der FCC-Virusernte führen.

4.3.4 Die Detektion freier *Mollicutes*-DNA

Mit den klassischen Kultivierungsverfahren wurden bisher ausschließlich lebende, koloniebildende Einheiten nachgewiesen. Durch den Einsatz von PCR-basierten Methoden werden zusätzlich auch bereits abgestorbene Zellen und freie DNA detektiert. Aus diesem Grund wurde die Sensitivität des CytoInspect™ Systems bei der Detektion freier DNA der *Mollicutes* in dieser Arbeit untersucht.

Freie (nicht zellgebundene) DNA wurde mit dem CytoInspect™ Kit der Fa. Greiner Bio-One weniger sensitiv nachgewiesen als zellgebundene DNA, da diese bei der initialen Zentrifugation bei 4500 x g für 20 Minuten nicht pelletiert wurde. Für diese Tests wurde PCR-Wasser als Probenmatrix verwendet, um zu verhindern, dass die DNA an Matrixbestandteile bindet und durch diese mit pelletiert wird. Dennoch bewirkte die Zentrifugation eine Anreicherung der genomischen DNA um den Faktor = 10, in den 100 µl der Probe, die nach der Zentrifugation und dem Abgießen des Überstands in der Spitze der Probengefäße zurück blieben. Am Beispiel der genomischen DNA von *A. laidlawii* konnte gezeigt werden, dass durch die initiale Zentrifugation der 10 ml Proben die genomische DNA bis zu einer Konzentration von 50 fg/ml detektiert werden kann, ohne die initiale Zentrifugation dagegen nur bis 500 fg/ml (siehe Kapitel 3.5).

Da in der Routine 10 ml Probenvolumen eingesetzt werden sollen, entsprechen 50 fg/ml insgesamt 500 fg pro Probe, die für einen positiven Nachweis enthalten sein müssen. Die Genomgröße von *A. laidlawii* beträgt 1,64 fg/Genom, sodass 500 fg genomischer DNA ca. 300 Genomen (bzw. Zellen) entsprechen. In dieser Arbeit konnte anhand des GC/KBE-Verhältnisses des Referenzstandards von *A. laidlawii* (siehe Kapitel 3.2.7) sowie der Veränderung des GC/KBE-Verhältnisses im Verlauf der Wachstumskurve (siehe Kapitel 3.2.8) gezeigt werden, das koloniebildende Einheiten (KBE) von *A. laidlawii* mindestens 5 bis 10 Genomkopien enthalten. Ausgehend von dem geringstmöglichen GC/KBE-Verhältnis dieser Spezies

von 5 GC/KBE entsprechen 300 Genome ca. 60 KBE/ml. Um freie, genomische DNA zu detektieren, ist also eine höhere Konzentration notwendig, als für den Nachweis der *Mollicutes*-Zellen.

Das bedeutet, ein beliebiges Produkt, welches mit einer detektierbaren Menge freier *Mollicutes*-DNA kontaminiert ist, muss zu einem früheren Zeitpunkt eine ausreichende DNA- oder Zellkonzentration enthalten haben, die mit dem CytoInspect™ Kit detektierbar gewesen wäre. Eine Möglichkeit positive Ergebnisse durch freie, genomische DNA mit großer Sicherheit zu verhindern bzw. frühzeitig zu entdecken, ist dem zu Folge die Testung der Rohstoffe oder Produktvorstufen vor deren Einsatz in den Produktionsprozessen.

Bei der bisherigen Betrachtung wurde nicht berücksichtig, dass die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung an viele Oberflächen und Moleküle adhärieren kann (Das, et al., 2010; Harmsen, et al., 2012). Die Probenmatrix aus der Produktion zellkulturbasierter Impfstoffe enthält in den meisten Fällen viele Bestandteile, an die DNA-Moleküle binden und bei der Zentrifugation mit pelletiert werden können. Somit ist die Wahrscheinlichkeit die DNA von *Mollicutes* zu detektieren tatsächlich größer, als es die Ergebnisse, der in dieser Arbeit durchgeführten Tests mit PCR-Wasser, vermuten lassen.

Durch die Detektion von freier DNA entsteht zwar zum einen ein Risiko, dass positive Ergebnisse durch DNA-Fragmente verursacht werden, ohne dass eine lebende Kontamination vorliegt. Zum anderen deutet das Vorhandensein von DNA jedoch auf eine Kontamination in einem früheren Stadium des Herstellungsprozesses hin. Die Quelle einer solchen DNA-Kontamination frühzeitig zu entdecken hat zwei Vorteile: erstens kann so verhindert werden, dass es aus dieser Quelle zu lebenden Kontaminationen der Fermentationsanlagen kommt; zweitens hat eine *Mollicutes*-Kontamination häufig einen Einfluss auf die betreffende Umgebung. Dies kann zur Folge haben, dass ein Rohstoff oder eine Vorstufe des Produkts, z.B. in Bezug auf seine Inhaltsstoffe, unbemerkt verändert wird, was wiederrum Einfluss auf das betreffende Endprodukt haben kann. Wäre man in der Lage solche Materialien bzw. Materialchargen auszusortieren, könnte die gleichbleibende Qualität der Produkte besser gewährleistet werden. Nicht zu Letzt besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei einer vermeidlichen Kontamination mit DNA nicht um freie DNA handelt, sondern um eine *Mollicutes*-Spezies, die als lebende Kontamination vorliegt, aber mit den klassischen Verfahren bisher nicht detektiert werden konnte.

4.3.5 Anreicherung der *Mollicutes* in den Proben durch Vorkultivierung

Im Zusammenhang mit der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen und der Sensitivität der PCR-basierten Methoden im Vergleich mit den kultivierungsbasierten Verfahren wird von den Vertretern der Behörden die Vorkultivierung diskutiert (Volokhov, et al., 2008; Kong, et al., 2007). Dabei soll eine Inkubation der Proben mit einer geeigneten Zellkultur für bis zu 7 Tage erfolgen, wodurch die enthaltenen *Mollicutes* angereichert werden. Auf diese Weise soll die Sensitivität der Detektion erhöht werden. Dabei ist zu bedenken, dass ein solcher Schritt den Zeitvorteil der PCR-basierten Methoden wieder deutlich reduziert, wodurch die produktionsbegleitende Testung (In-Prozess Kontrollen) und die Testung vieler Rohstoffe mit

kurzer Haltbarkeit wieder ausgeschlossen wird. Zudem funktioniert die Vorkultivierung nur bei den *Mollicutes,* die unter den gegebenen Bedingungen wachsen können. Für solche, die sich nicht vermehren, würde die Sensitivität wieder verringert, da es bei der Inkubation der Proben mit der Zellkultur zu einer Verdünnung der Probe und den darin enthaltenen *Mollicutes* kommt. Um dies zu verhindern, müssten in diesem Fall die originale Probe und die Vorkultur getestet werden. Auf der anderen Seite kann in manchen Fällen die Anzucht von Zellkulturen für Produktionszwecke ebenfalls als Vorkultivierung der *Mollicutes* betrachtet werden, so dass für Fermenterernten oder Zellkulturen unter Umständen keine zusätzliche Vorkultivierung der Proben notwendig ist. Voraussetzung ist hierbei, dass die jeweilige Zellkultur für die Vermehrung der *Mollicutes* geeignet ist.

4.4 Evaluierung der Spezifität und Robustheit der Methode

4.4.1 Die Robustheit der *Mollicutes*-Detektion mit dem CytoInspect™ Kit

Ein Testverfahren, welches als Routineanwendung zum Einsatz kommen soll, muss möglichst unempfindlich gegenüber kleineren Variationen und Änderungen sein, die im alltäglichen Betrieb auftreten können. In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Parameter bei der Durchführung der Tests zur Bestimmung der Sensitivität variiert und deren Effekte auf die Ergebnisse des Testverfahrens bewertet (siehe Kapitel 3.3.1). Dazu wurden die SNR-Werte (Signal-to-Noise-Ratio) der Fluoreszenzsignale des Microarrays von den Extraktions- und PCR-Positivkontrollen jedes einzelnen Tests betrachtet. Die Parameter Zeitpunkt, PCR-Cycler, Kit- und Probenmatrix-Chargen hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse und zeigten, dass das Testverfahren selbst sehr robust ist. Dagegen haben eine zu große Anzahl der Proben die gleichzeitig bearbeitet werden und unzureichendes Training der Operatoren bzw. eine fehlende Routine bei der Testdurchführung negative Auswirkungen auf die Ergebnisse des CytoInspect™ Kits. Die Einarbeitung und Entwicklung eines sicheren, routinierten Ablaufs kann jedoch sehr zügig erfolgen, so dass auch nach kurzer Zeit Operator-unabhängige, zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. Die maximale Probenanzahl sollte unter den in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle bei NVD in Marburg gegebenen Bedingungen 16 Proben pro Testlauf nicht übersteigen. Unter Einhaltung dieser Vorgaben ist die zuverlässige Durchführung des Testverfahrens unter Routinebedingungen zu gewährleisten.

Bei dieser Auswertung der SNR-Werte muss jedoch berücksichtigen werden, dass die Stärke der Fluoreszenzsignale nicht direkt proportional zur DNA-Menge ist. Es ist also nicht möglich absolute Grenzwerte für die SNR-Werte zu definieren, anhand derer festgelegt werden kann, wann ein Test inhibiert ist. Die SNR-Werte können immer nur vergleichend betrachtet werden.

4.4.2 Die Spezifität der Detektion von *Mollicutes* mit dem CytoInspect™ Kit

Spezifität bedeutet, dass ausschließlich das Vorhandensein von *Mollicutes* in einer Probe zu einem positiven Testergebnis führt. Die DNA anderer Bakterien oder der Probenmatrizen (Produkte) darf dagegen nicht detektiert werden. Sollte dies jedoch nicht verhindert werden können, müssen gemäß E.P. 7.2 geeignete Maßnahmen implementiert werden, mit denen Kontaminationen als *Mollicutes* bestätigt bzw. identifiziert werden können (EDQM, 2011).

In dieser Arbeit wurden insgesamt 10 verschiedene Bakterien mit dem CytoInspect™ Kit getestet. Im Rahmen der Versuche zur Auswahl der am besten geeigneten Methode wurde bereits sechs Bakteriensuspensionen mit 10^3 KBE/ml eingesetzt. Während der Evaluierung der Methode wurden weitere Bakterien getestet, von denen DNA-Extrakte hergestellt und in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 ng/ml und 1 pg/ml) in die PCR eingesetzt wurden. Mit dem CytoInspect™ Kit wird die ITS-Sequenz der rRNA-Sequenz amplifiziert. Die Primer der PCR binden dabei im Bereich der Gene der 16S und 23S Untereinheiten der Ribosomen, die die ITS-Sequenz flankieren. Die Sequenz der rRNA-Gene ist hoch konserviert und unterscheidet sich bei nah verwandten Organismen nur sehr wenig (Volokhov, et al., 2006). Die Gefahr, dass die Primer der PCR oder die Sonden auf dem Microarray an die DNA bzw. PCR-Produkte anderer Bakterien binden, ist daher bei nahverwandten Spezies am größten. Aus diesem Grund wurden für diese Tests Spezies aus den Gattungen *Streptococcen, Clostridia* und *Bacilli* ausgewählt. Zusätzlich wurden weitere Spezies getestet, die in den Jahren 2010 und 2011 sehr häufig bei NVD in Marburg identifiziert wurden und daher mit großer Wahrscheinlichkeit später in den Routineproben enthalten sein können. Keine der insgesamt zehn Arten verursachte ein Fluoreszenzsignal auf dem Microarray. Neben den verschiedenen Bakterien wurden alle Chargen, der in dieser Arbeit verwendeten Probenmatrizen, mit dem CytoInspect™ Kit getestet. Auch hier kamen keine positiven Tests vor.

Durch die Testung nahverwandter Spezies und die Verwendung bioinformatischer Methoden bei der Entwicklung der Primer und Sonden kann die Detektion weiterer Bakterienarten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Das CytoInspect™ Kit ermöglicht somit eine sehr spezifische Detektion von *Mollicutes*.

4.5 **Bewertung der Testsicherheit**

4.5.1 Das Risiko für falsch-positive Ergebnisse

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, dass es sich bei unspezifischen Ergebnissen um positive Ergebnisse handelt, die durch die falsche Bindung der Primer und Sonden entsteht. Der Unterschied zwischen unspezifischen und falsch-positiven Ergebnissen ist, dass bei letzterem tatsächlich eine Kontamination durch *Mollicutes*-Zellen oder deren DNA vorliegt, die erst nachtäglich bei der Bearbeitung der Proben im Rahmen der Qualitätskontrolle eingebracht wurde. Das Produkt oder die Produktstufe, aus der

die Probe stammt, ist in diesem Fall frei von *Mollicutes*. Ein falsch-positives Ergebnis lässt sich nicht ohne weiteres von einem echten, positiven Ergebnis unterscheiden. Das Vorliegen eines falsch-positiven Ergebnisses muss daher im Rahmen von meist sehr umfangreichen sowie zeit- und kostenintensiven Untersuchungen bewiesen werden. Gelingt dieser Beweis nicht, muss die Charge verworfen werden. Daher ist es von größter Wichtigkeit Kontaminationen während der Bearbeitung der Proben von vornherein zu vermeiden.

In dieser Arbeit wurden alle Kontaminationsquellen sowie mögliche Ursachen, die zur Verbreitung der Kontaminationen in der Arbeitsumgebung beitragen könnten, identifiziert (siehe Kapitel 3.6.1). Zur Prävention von Kontaminationen wurde ein Maßnahmenkatalog erarbeitet, der bei der Durchführung des Verfahrens umgesetzt werden muss. Dieser umfasst die bereits vorhandenen Hygienevorschriften der Labore der mikrobiologischen Qualitätskontrolle, in denen die molekularbiologischen Analysen durchgeführt werden. Zusätzlich zu diesem bereits bestehenden, hohen Hygienestandard wurden weitere Maßnahmen implementiert. Diese dienen vor allem der Vermeidung von Kontaminationen durch den direkten Kontakt zum Operator und von Kreuzkontaminationen der Proben untereinander, z. B. durch das Berühren der einzelnen Probengefäße nacheinander beim Öffnen und Schließen. Da DNA im Vergleich zu lebenden Zellen sehr stabil und über einen langen Zeitraum nachweisbar ist, lag ein weiterer Focus auf der Vermeidung der Verbreitung von DNA-Spuren in der Arbeitsumgebung. Dekontaminationsmittel zur DNA-Beseitigung sind in der Regel sehr giftig und stellen ein Gesundheitsrisiko für den Operator dar. Daher sollte der Einsatz solcher Mittel auf ein Minimum beschränkt werden und stattdessen mehr Gewicht auf die Präventionsmaßnahmen gelegt werden. Dies ist deutlich an der Gegenüberstellung der möglichen Kontaminationsquellen mit den verschiedenen Präventionsmaßnahmen zusehen (siehe Kapitel 3.6.1, Tabelle 3.29). Speziell die Maßnahmen, die die Verbreitung von Kontaminationen in der Arbeitsumgebung verhindern sollen (siehe Tabelle 3.29, XIV – XVII), haben auf besonders viele der potentiellen Quellen Einfluss und tragen besonders effektiv zur Risikominimierung bei. So kann sichergestellt werden, dass auch eine Testung zur Chargenfreigabe mit möglichst geringem Risiko für falsch-positive Ergebnisse in diesem Bereich durchgeführt werden kann.

Die direkte Überprüfung der Wirksamkeit dieser Maßnahmen war nicht möglich, da unbeabsichtigte Kontaminationen der Proben während der Handhabung nicht realistisch reproduzierbar sind und zudem ein zu großes Risiko für die Routinetests darstellen. Die bisherigen Erfahrungen, die seit Einführung dieser Maßnahmen gesammelt wurden, zeigen aber, dass die kontaminationsfreie Bearbeitung der Proben mit großer Sicherheit möglich ist, da seit der Einführung dieser Maßnahmen keine falsch-positiven Ergebnisse auftraten. Mit dem CytoInspect™ Kit konnten mit Hilfe des Microarrays mehrere, verschiedene *Mollicutes*-Spezies gleichzeitig, d. h. in derselben Probe detektiert werden. Dadurch hätte man Kreuzkontaminationen leicht erkennen können, selbst wenn die Proben, wie bei den Tests zur Bestimmung der Nachweisgrenze, bereits künstlich mit *Mollicutes* versetzt wurden.

4.5.2 Das Risiko für falsch-negative Ergebnisse

Ein falsch-negatives Ergebnis bedeutet, dass eine Kontamination einer Probe vorliegt, aber mit dem CytoInspect™ Kit nicht detektiert wird. Auch ein falsch-negatives Ergebnis ist nicht von einem echten, negativen Ergebnis zu unterscheiden. Dieses Risiko muss daher weitestgehend minimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die einzelnen Schritte der Durchführung des CytoInspect™ Kits, mit Blick auf das Risiko *Mollicutes*-Zellen oder ihre DNA zu verlieren und so nicht mehr nachweisen zu können, betrachtet.

Als kritischster Schritt wurde die Zentrifugation der 10 ml Proben zu Beginn der DNA-Extraktion identifiziert. Dieser Schritt wird als einziger nicht von den Positivkontrollen überwacht. Die Quantifizierung der pelletierten Zellen hat gezeigt, dass 10 bis 20 % der *Mollicutes* im Überstand verbleiben und mit diesem verworfen werden (siehe Kapitel 3.6.2). Trotz dieses Verlusts lag die Nachweisgrenze der Methode unter 10 KBE/ml. Durch die Zentrifugation der Proben bei höheren Drehzahlen kann dieser Prozentsatz der verlorenen Zellen vermutlich weiter reduziert werden. Aus statistischen Gründen kann jedoch auch dann nur maximal eine Nachweisgrenze zwischen 0,1 und 1 KBE/ml erreicht werden. Durch die Zentrifugation bei höheren g-Zahlen könnten außerdem vermehrt Bestandteile aus den Proben im Pellet angereichert werden, die die Tests inhibieren. Dies hätte dann genau den gegenteiligen Effekt zur stärkeren Anreicherung der *Mollicutes* im Pellet.

Neben der initialen Zentrifugation entsteht auch beim Anlegen der PCR-Reaktion ein Risiko für falsch-negative Ergebnisse, da nur ein Fünftel des DNA-Extrakts als Template eingesetzt und weiter getestet wird. Im Gegensatz zur initialen Zentrifugation der Proben wird dieser Schritt, ebenso wie die DNA-Extraktion, mit der Extraktions-Positivkontrolle überwacht.

Um das Risiko für falsch-negative Ergebnisse näherungsweise zu quantifizieren, wurde unter Berücksichtigung der Schritte deren Risiko quantifiziert werden konnte, die theoretische Nachweisgrenze berechnet. In dieser Arbeit wurde am Beispiel einer 10 ml Probe, die aus einer Produktstufe mit einem Volumen von 100 l entnommen wird, berechnet, dass rein statistisch 0,3 *Mollicutes*-Zellen pro Milliliter in der Probe enthalten sein müssen, damit diese mit 95 % Wahrscheinlichkeit detektiert werden können (siehe Kapitel 3.6.2). Berücksichtigt man nun zusätzlich, dass im ungünstigsten Fall nur 80 % der Zellen bei der initialen Zentrifugation pelletiert werden und nur 1/5 des DNA-Extrakts in die PCR-Reaktion eingesetzt wird, erhöht sich diese theoretische Nachweisgrenze auf ca. 2 KBE/ml. Die praktische Sensitivität, die in dieser Arbeit bestimmte wurde, ergab eine Nachweisgrenze von ca. 5 KBE/ml für die Rabies-Virusernte (siehe Kapitel 3.3.1) und ca. 2 KBE/ml für NaCl-Pepton-Puffer (siehe Kapitel 3.3.4). Im direkten Vergleich stimmen also die theoretisch berechnete und die praktisch bestimmte Nachweisgrenze für diese beiden Produkte überein. Daraus kann man schließen, dass die Schritte der DNA-Extraktion des CytoInspect™ Kits, deren Effektivität in dieser Arbeit nicht direkt quantifiziert wurden, keine maßgeblichen Verluste der DNA aufweisen. Voraussetzung ist jedoch, dass die Methode ungehemmt funktioniert.

5 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PCR-basierte Detektion von *Mollicutes* mit Hilfe des CytoInspect™ Kits der Fa. Greiner Bio-One mit einer vergleichbaren Sensitivität durchgeführt werden kann, wie die bisherigen Kultivierungstests. Die Robustheit des Verfahrens und somit auch die Eignung als Routineanwendung sind dabei gegeben. Alle *Mollicutes* können spezifisch nachgewiesen werden. Die Anforderungen der E.P. und der USP an eine PCR-basierte Methode zur Prüfung der Abwesenheit von *Mycoplasma* können daher mit diesem Verfahren erfüllt werden, sodass die Validierung der Methode erfolgen kann.

Die Detektion der *Mollicutes* unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit und die automatische Ablesung und Auswertung der Ergebnisse führen zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität. Durch den Einsatz PCR-basierter Methoden kann außerdem die Testdauer erheblich verkürzt werden. Dies hat mehrere Vorteile. Zum einen können Zwischenprodukte und Rohstoffe, die zum Teil nur sehr kurze Haltbarkeitszeiten haben, noch vor deren Einsatz in der Produktion auf *Mollicutes* überprüft werden, so dass die folgenden Prozessschritte nicht parallel zur Qualitätskontrolle und damit „at risk“ durchgeführt werden müssen. Zum anderen kann im Fall einer *Mollicutes*-Kontamination die Ursachenanalyse zügig durchgeführt werden, sodass Gegenmaßnahmen schnell getroffen werden können. Dadurch wird in vielen Fällen die Wirksamkeit der Maßnahmen deutlich erhöht, da lang andauernde, unbehandelte Kontaminationen sich weiter verbreiten und zusätzliche Anlagenteile kontaminieren können. Nicht zu Letzt bietet die PCR-basierte Methode, neben der Verbesserung der Qualität, auch die Möglichkeit zwei Methoden (Kultivierungstest und Indikatorzelltest) durch Eine zu ersetzten und so Arbeitszeit und Kosten zu sparen. Dem gegenüber steht der scheinbar einzige Nachteil der PCR-basierten Methode, die keine Möglichkeit zur Unterscheidung der lebenden von toten *Mollicutes* bietet. Durch die Testung von Rohstoffen und Produktvorstufen vor deren Einsatz in den Fermentationsanlagen, ermöglicht sie jedoch die frühzeitige Erkennung potentieller *Mollicutes*-Quellen und tragen so zur Prävention von Kontaminationen der Produktionsanlagen bei. Durch den Einsatz dieser Methode können so die Qualität und die Sicherheit der bei Novartis Vaccines & Diagnostics produzierten Impfstoffe verbessert werden.

6 Literaturverzeichnis

Life Technologies, 2008. *MicroSEQ Mycoplasma Real-Time PCR Detection Kit.* Foster City(California): Life Technologies.

Abu-Amero, K. K., Miles, R. J. & Halablab, M. A., 2005. Cholesterol Protects Acholeplasma laidlawii Against Oxidative Damage Caused by Hydrogen Peroxide. *Veterinary Research Communications,* pp. 373-380.

Addey, J. P., Taylor-Robinson, D. & Dimic, M., 1969. Viability of Mycoplasmas after Storage in Frozen or Lyophilised States. *Journal of Medical Microbiology,* pp. 137-145.

Addey, J. P., Taylor-Robinson, D. & Dimic, M., 1970. Viability of Mycoplsmas After Storage In Frozen or Lyophilised States. *Journal of Medical Microbiology,* Band 3, pp. 137-145.

Afshar, B. et al., 2008. Biochemical and genetic variations in Mycoplasma fermentans strain from cell line, human and animal sources. *Journal of Applied Microbiology,* pp. 498-505.

Amikam, D., Glaser, G. & Shmuel, R., 1984. Mycoplasma (Mollicutes) Have a Low Number of rRNA Genes. *Journal of Bacteriology,* 158(1), pp. 376-378.

Armstrong, S. E., Mariano, J. A. & Lundin, D. J., 2010. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals,* pp. 211-213.

Athamna, A. et al., 1997. Adherence of Mycoplasma gallisepticum Involves Variable Surface Membrane Proteins. *Infection and Immunity,* pp. 2468-2471.

Bébéar, C. M. & Pereyre, S., 2005. Mechanisms of Drug Resistance in Mycoplasma pneumoniae. *Current Drug Targets - Infectious Disorder,* pp. 263-271.

Becton Dickenson and Company, 2011. [Online] Available at: http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsmicrocount/index.jsp [Zugriff am 02 09 2011].

Bernstein-Ziy, R., 1969. Cell division in Mycoplasma gallispeticum. *Canadian Journal of Microbiology,* pp. 1125-1128.

BfArM, 2011. *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.* [Online] Available at: http://www.bfarm.de/DE/Home/home_node.html [Zugriff am 03 2011].

Biberfeld, G. & Biberfeld, P., 1970. Ultrastructural Features of Mycoplasma pneumoniae. *Journal of Bacteriology,* pp. 855-861.

Blanchard, A. & Bébéar, C. M., 2002. Mycoplasmas of Human. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 45-71.

Boonyayatra, S., Besser, T. E., Sawant, A. & Gay, J. M., 2010. Effects of storage methods on the recovery of Mycoplasma species. *Veterinary Micorbiology,* pp. 210-213.

Bredth, W., Heunert, H. H., Hoefling, K. H. & Milthaler, B., 1973. Microcinematographic studies of Mycoplasma hominis cells. *Journal of Bacteriology,* pp. 1223-1227.

Brown, D. et al., 1995. Taxonomic analysis of the tortoise mycoplasmas Mycoplasma agassizii and Mycoplasma testudinis by 16S rRNA gene sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology,* pp. 348-350.

Bundesministerium der Justiz, 2006. *Leitfaden der guten Herstellungspraxis Teil 1, Anlage 2 des AMWHV,* s.l.: Bundesministerium für Gesundheit.

CBER, 2010. *Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases,* Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Biological Evaluation and Research.

Cheng, H. S., Shen, C. W. & Wang, S. R., 2007. Effects of storage conditions on detection of mycoplasma in biopharmaceuticals products. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal,* pp. 113-119.

Chen, X. & Finch, L. R., 1989. Novel arrangement of rRNA Genes in Mycoplasma gallispeticum: Seperation of the 16S Gene of One Set from the 23S and 5S Genes. *Journal of Bacteriology,* 171(5), pp. 2876-2878.

Das, T., Sharma, P. K. & Busscher, H. J., 2010. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Applied and Evironmental Microbiology,* 76(10), pp. 3405-3408.

Debrazhynetskaya, A. et al., 2011. Preparation of reference strains for validation and comparison of mycoplasma testing methods. *Journal of Applied Microbiology.*

Drexler, H. G. & Uphoff, C. C., 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology,* pp. 75-90.

Dworkin, M. et al., 2006. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition.* New York: Springer.

EDQM, 2011. *EDQM European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care.* [Online] Available at: http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html

EDQM, 2011. *Europäische Pharmakopöe; Chapter 2.6.7. Mycoplasmas,* Strasbourg: Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln (EDQM).

EMA, 2011. *European Medicine Agency - Science Medicines and Health.* [Online] Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/home/Home_Page.jsp [Zugriff am 03 2011].

FDA, 2011. *USP 34, Chapter 63 Mycoplasma Tests,* Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA).

Frey, J., 2002. Mycoplasmas of Animals. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 73-90.

Furness, G., Whitscarver, J., Trocola, M. & De Maggio, M., 1976. Morphology, ultrastructure and mode od division of Mycoplasma fermentans, Mycoplasma hominis, Mycoplasma orale and Mycoplasma salivarium. *Journal of Infectious Deseases,* pp. 224-229.

Furr, P. M. & Taylor-Robinson, D., 1990. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. *Journal of Medical Microbiology,* pp. 203-206.

Furr, P. M. & Taylor-Robinson, D., 1990. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. *Journal od Medical Microbiology,* Band 31, pp. 203-206.

Gasparich, G. E., 2010. Spiroplasma and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals,* pp. 193-203.

Geigert, J., 2005. Mycoplasma Contamination in Manufacturing Operations Originating From Plant-Derived Materials. *Science & Technologies - PDA Letters*, November/December, pp. 11-15.

Grabowski, M. W., Rottem, S. & Barile, M. F., 1976. Cholesterol Requirement of Mycoplasmas as Detemined by a Microtiter Test Using Polyene Antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology,* pp. 110-112.

Greiner Bio-One, 2010. *Mycoplasma Kit - Instructions for use.* Frickenhausen: Greiner Bio-One.

Groebel, K. et al., 2009. Mycoplasma suis Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and Immunity,* pp. 576-584.

Harmsen, M., Lappmann, M., Knochel, S. & Molin, S., 2012. Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology,* 76(7), pp. 2271-2279.

Johansson, K. E. & Pettersson, B., 2002. Taxonomy of Mollicutes. In: *Molecular biology and pathogenicity of mycoplamas*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 1-29.

JP, 2011. *Japanese Pharmacopoeia XIV, General Information, Chapter 9,* Tokyo: Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

Kang, Y. J., Mei, L. J., Piao, Z. & Yin, S. X., 2010. Multiple copies of 16s rRNA gene affect the restriction patterns and DGGE profile as revealed by analysis of genome database. *Mikrobiologiia,* 79(5), pp. 664-671.

Kazemiha, V. et al., 2009. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology,* pp. 117-124.

Kleven, S. H., 1998. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poultry Science,* pp. 1146-1149.

Kong, H. et al., 2007. Application of cell culture enrichment for improving the sensitivity of mycoplasma detection methods based on nucleic acid amplification technology (NAT). *Applied Microiological Biotechnology,* pp. 223-232.

Kornspan, J. D., Tarshis, M. & Rottem, S., 2011. Adhesion and biofilm formation of Mycoplasma pneumoniae on an abiotic surface. *Archives of Microbiology*, 10 August, 193(11), pp. 833-836.

Life Technologies, 2008. *PrepSEQTM Mycoplasma Nucleic Acid Extraction Kit.* Foster City(California): Life Technologies.

Liu, W. et al., 2010. Genome Announcementa: Complete Genome Sequence of Mycoplasma Hyorhinis Strain HUB-1. *Journal of Bacteriology,* 192(21), pp. 5844-5845.

Maniloff, J., 2002. Phylogeny and evolution. In: *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.* New York: Kluver Academic/Plenum Publishers, pp. 31-34.

Mariotti, P. et al., 2010. Pneumonia´s link with head and heart. *Lancet,* p. 388.

Marois, C., Oufour-Gesbert, F. & Kempf, I., 2000. Detection of Mycoplasma synoviae in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology,* pp. 311-318.

McAuliffe, L. et al., 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology,* pp. 913-922.

Meloni, G. A., Bertoloni, G., Busolo, F. & Conventi, L., 1980. Colony Morphology, Ultrastructure and Morphogenesis in Mycoplasma hominis, Acholeplasma laidlawii and Ureaplasma urealyticum. *Journal of General Microbiology,* pp. 435-443.

Miyata, M., 2002. Cell Division. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, pp. 117-130.

Molecular Devices, 2010. [Online] Available at: http://www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Threshold-System.html [Zugriff am 02 09 2011].

Much, P. et al., 2002. Mycoplasma gallisepticum Influence of cell invasiveness on the outcome of exprimental infection in chickens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology,* pp. 181-186.

Mülhardt, C., 2003. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.* Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Nagatomo, H. et al., 2001. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. *Veterinary Microbiology,* pp. 223- 232.

Norman, M. C., Franck, E. B. & Choate, R. V., 1970. Preservation of Mycoplasma Strains by Freezing in Liquid Nitrogen and by Lyophilization with Sucrose. *Applied Microbiology,* 20(1), pp. 69-71.

PDA, 2010. *Technical Report No. 50 Alternative Methodes for Mycoplasma Testing,* Bethesda, MD: Parenteral Drug Association Inc..

Priore, S. F., Moss, W. N. & Turner, D. H., 2012. *Influenza A Virus Coding Regions Exhibit Host-Specific Global Ordered RNA Structure,* New York: Public Library of Science.

Raccach, M., Rottem, S. & Razin, S., 1975. Survival of Frozen Mycoplama. *Applied Microbiology,* pp. 167-171.

Raccach, M., Rottem, S. & Razin, S., 1975. Survival of Frozen Mycoplasmas. *Applied Microbiology,* 30(2), pp. 167-171.

Razin, S., 1978. The Mycoplasmas. *Microbiological Reviews,* pp. 414-470.

Razin, S., 1996. Mycoplasmas. In: *Medical Microbiology, 4th Edition.* Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch.

Razin, S., 2006. The Genus Mycoplasma and Related Genera (Class Mollicutes). In: *Prokaryotes.* s.l.:s.n., pp. 836-904.

Razin, S. & Freundt, E. A., 1984. The Mycoplasmas. In: *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology Volume 1.* Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 740-790.

Razin, S. & Hayflick, L., 2010. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals,* pp. 183-190.

Razin, S. & Herrmann, R., 2002. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.* s.l.:Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Razin, S., Naot, Y. & Yogev, D., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* pp. 1094-1156.

Rechnitzer, H. et al., 2010. Genomic features and insights into the biology of Mycoplasma fermentans. *Microbiology,* 157(3), pp. 760-773.

Rivera, A. et al., 2002. Experimental arthritis induced by a clinical Mycoplasma fermentans isolate. *BMC Musculoskeletal Disorders.*

Robinson, L. & Wichelhausen, R. H., 1956. Contamination of human cell cultures by pleuropneumoniaelike organisms.. *Science,* pp. 1147-1148.

Roche Diagnostics GmbH, 2008. *MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit.* Penzberg: Roche Applied Science.

Romero-Arroyo, C. E. et al., 1999. Mycoplasma pneumoniae Protein P30 Is Required for Cytadherence and Associated with Proper Cell Development. *Journal of Bacteriology,* pp. 1079-1087.

Rottem, S. & Naot, Y., 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology,* November, Band 6, pp. 436-440.

Sánchez-Vargas, F. M. & Gómez-Duarte, O. G., 2008. Mycoplasma pneumoniae - an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clinical Microbiology and Infection,* pp. 105-115.

Sato, N. et al., 2010. Promotion of arthritis and allergy in mice by aminoglycoglycerophospholipid , a membrane antigen specific to Mycoplasma fermentans. *FEMS Immunology & Medical Microbiology,* pp. 33-41.

Seemueller, E., Garnier, M. & Schneider, B., 2002. Mycoplasma of Plants and Insects. In: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* New York: Kluwer academic / Plenum Publishers, pp. 91-115.

Somarajan, S. R., Kannan, T. R. & Baseman, J. B., 2010. Mycoplasma pneumoniae Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serin-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cellular Microbiology,* pp. 1821-1831.

Taylor-Robinson, D. & Behnke, J., 1987. The prolonged persistence of mycoplasmas in culture. *Journal of Medical Microbiology,* pp. 89-92.

Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M. & Mettifogo, E., 2006. Detection of multiple mycoplasma infections in cell cultures by PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* pp. 907-914.

Török, E., Moran, E. & Cooke, F., 2009. *Oxford Handbook of Infectious Deseases and Microbiology.* : Oxford University Press.

U.S. Department of Health and Human Services, 2011. *Code of Federal Regulations, Title 21, Part 610, Subpart D - Mycoplasma,* Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services.

U.S. Department of Health and Human Services, 2011. *U.S. Food and Drug Administration - Protecting and Promoting your Health.* [Online] Available at: http://www.fda.gov/default.htm [Zugriff am 05 2011].

Ueno, P. M. et al., 2008. Interaction of Mycoplasma genitalium with host cells: evidence for nuclear localization. *Microbiology*, Issue 154.

Vogl, G. et al., 2008. Mycoplasma gallisepticum Invades Chicken Erythrocytes during Infection. *Infection and Immunity,* pp. 71-77.

Volokhov, D. V., Chandler, D. K. F. & Chizhikov, V., 2010. Potential Mycoplasma Contaminants: Inactivation during Production of Inactivated Egg-Based Viral Vaccines. *Viral Clearence,* pp. 108-112.

Volokhov, D. V. et al., 2006. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology,* Issue 71, pp. 680-698.

Volokhov, D. V., Graham, L. J., Brorson, K. A. & Chizhikov, V. E., 2011. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiolgical techniques. *Molecular an Cellular Probes,* pp. 69-77.

Volokhov, D. V. et al., 2008. Biological Enrichment of Mycoplasma Agents by Cocultivation with Permissive Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology,* pp. 5383-5391.

Volokov, D. V. et al., 2007. Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus Acholeplasma: Phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* Band 44, pp. 699-710.

Weisburg, W. et al., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasma: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology,* pp. 6455-6467.

Windsor, H. M., Windsor, D. G. & Noodergraaf, J. H., 2010. The growth and long term survival of Acholeplasma laidlawii in media products used in biopharmaceutical manufacturig. *Biologicals,* pp. 204-210.

Winner, F. et al., 2003. Phenotypic switching in Mycoplasma gallisepticum Hemadsorption Is Governed by High Frequency, Reversible Point Mutations. *Infection and Immunity,* pp. 1265-1273.

Winner, F., Rosengarten, R. & Citti, C., 2000. In Vitro Cell Invasion of Mycoplasma gallisepticum. *Infection and Immunity,* pp. 4238-4244.

Woese, C. R., Maniloff, J. & Zablen, L. B., 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Science,* pp. 494-498.

Yavlovich, A. et al., 2004. Mycoplasma fermentans Binds to and Invades HeLa Cells: Involvement of Plasminogen and Urokinase. *Infection and Immunity,* pp. 5004-5011.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Etablierung einer PCR-basierten Methode zur Detektion von *Mollicutes*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, den 23. Mai 2012

Dipl. Biol. Anne Broge

Danksagung

Ich danke Herr Prof. Dr. Johann Heider für die wissenschaftliche Betreuung und die unkomplizierte Zusammenarbeit während der Erstellung meiner Doktorarbeit bei Novartis Vaccines & Diagnostics in Marburg. Weiterhin danke ich ihm und Prof. Dr. Ralf Conrad für die Begutachtung meiner Dissertation sowie Prof. Dr. M. Bölker und Prof. Dr. K. Lingelbach, dass sie sich als Prüfer meiner Disputation zur Verfügung zu gestellt haben.

Ich möchte mich außerdem bei Novartis Vaccines & Diagnostics bedanken für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und die vielen Gelegenheiten in dieser Zeit auch über mein Projekt hinaus Erfahrungen zu sammeln. Mein Dank geht in diesem Zusammenhang auch an Hans Joachim Zoller, von dem ich vieles über die Welt der globalen Projektleitung und Unternehmenspolitik lernen durfte.

Mein herzlichster Dank geht an Dana Kemnitz und Thomas Lukow. Ihr seid mir als Betreuer und Mentoren mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ihr habt mich gefordert und in jeder Hinsicht gefördert und mir dabei alle nötigen Freiräume gelassen. Ihr habt mir außerdem große Treue bewiesen und mich während der ganzen drei Jahre fachlich und persönlich jederzeit unterstützt, trotz aller neuen Herausforderungen und Veränderungen, die auch ihr in dieser Zeit bewältigen musstet.

Außerdem möchte mich bei allen meinen Kollegen bedanken, mit denen ich die letzten drei Jahre zusammen arbeitet durfte. Ich habe sehr viel von euch gelernt und dabei immer viel zu lachen gehabt. Ich werde mich sicher noch lange an Jogi und Heiner, den Pudel des Todes, die Sitzkreise mit Maultrommel und die vielen, anderen, schönen Stunden mit euch erinnern. Mit eurer großen Hilfsbereitschaft habt ihr alle zusammen einen Beitrag zum Erfolg des Projekts und damit auch zu meiner Doktorarbeit geleistet.

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit, die das Ende der umfangreichen Ausbildung darstellt, die ich genießen durfte, möchte ich auch die Gelegenheit nutzen mich bei meinen Eltern zu bedanken. Ihr habt mich Zeit meines Lebens bei allen meinen Plänen unterstützt und dafür gesorgt, dass ich meinen Weg bis heute gehen konnte.

Zu guter Letzt möchte ich Felix danken: für seine Geduld, seinen Humor und sein Verständnis, das er immer wieder für mich aufbringt.

Wissenschaftlicher Werdegang der Autorin

Name:	Anne Broge
Geburtsdatum/-ort:	14.06.1983, Minden (Westfalen)

Schulausbildung

09/1999 – 07/2002	**Gymnasium Stolzenau** Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2003 – 04/2008	**Studium der Biologie** an der Universität Karlsruhe (TH)
04/2008 – 01/2009	**Diplomarbeit** am Institut für angewandte Biowissenschaften in Kooperation mit der Nadicom GmbH zum Thema „Beschreibung einer neuen Art der Gattung *Trichosporon* und Prüfung seiner Eignung für die heterologe Proteinexpression“ unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Fischer
01/2009	Abschluss des Studiums der Biologie mit dem **Diplom**

Dissertation

04/2009 – 04/2012	Anfertigung der **vorliegenden Dissertation** bei Novartis Vaccines & Diagnostics in Zusammenarbeit mit dem Mikrobiologischen Institut der Philipps-Universität Marburg