

6 ZUSAMMENFASSUNG

M. bovis ist ein Erreger von Mastitiden der Kuh. Die *M. bovis*-Mastitis ist durch Therapieresistenz und durch einen enzootischen Verlauf gekennzeichnet. Zur Einschränkung der wirtschaftlichen Verluste ist eine frühzeitige Erkennung der infizierten Tiere äußerst wichtig. Da das Krankheitsbild selbst nicht pathognomonisch und der kulturelle Nachweis von *M. bovis* in der Milch zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zum Nachweis von *M. bovis* in Milch mittels PCR entwickelt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die optimalen Bedingungen eines PCR-Protokolls zur Detektion von *M. bovis* in Flüssigkultur ermittelt. Optimal erwies sich ein 50 µl Reaktionsansatz mit 10 mmol/l Tris/HCl (pH 8,8), 50 mmol/l KCl, 3,0 mmol/l MgCl₂, 0,01 % (w/v) Gelatine und anderen Stabilisatoren, je 50 µmol/l der vier dNTPs, je 10 pmol der pMB2-Primer und 2,5 U *Taq* Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 45 Reaktionszyklen mit 20 s Denaturierung bei 94 °C, 90 s Annealing bei 50 °C und 90 s Extension bei 72 °C.

Zur Ermittlung der Spezifität wurden verschiedene Mykoplasmen- und Bakterienstämme untersucht, sowie eine Größenbestimmung und Restriktionsanalyse der PCR-Produkte und eine Hybridisierung der PCR-Produkte mit der homologen pMB2-Sonde durchgeführt. Die Sensitivität des spezifischen und schnellen Nachweises wurde durch Untersuchung von DNS- bzw. Flüssigkulturverdünnungsreihen ermittelt und betrug 1 fg *M. bovis*-DNS bzw. 1 KbE (Kolonie bildende Einheit) von *M. bovis*.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die entwickelte PCR zur Detektion von *M. bovis* in Milch eingesetzt. In Vorversuchen mit artifiziell kontaminierter Milch (Konzentrierung der Milch durch Lyophilisation oder Zentrifugation) zeigte sich, daß die Milch aufgrund inhibierender Milchproteine vor der PCR aufgearbeitet werden muß. Dazu wurden verschiedene Behandlungsmethoden für die Gesamtmilch, das Milchsediment und das Milchserum getestet. Von diesen erwiesen sich zwei Methoden als geeignet zum Nachweis von *M. bovis* in Milch:

1. Verdünnung der Gesamtmilch in Aqua dest. (1:10) mit nachfolgender PCR, Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung des Gels
- Nachweisgrenze: 10⁴ KbE von *M. bovis*/ml Milch
2. Extraktion der *M. bovis*-DNS aus dem Milchserum mit nachfolgender erster und zweiter PCR, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung des Gels
- Nachweisgrenze: 10² KbE von *M. bovis*/ml Milch

Mit der Verdünnungsmethode wurden 35 Feldmilchproben auf *M. bovis* untersucht. Acht Proben, die in der Kultur positiv und in der PCR nach der Verdünnungsmethode negativ waren, wurden zusätzlich mit der Extraktionsmethode getestet. Hierdurch wurde *M. bovis* in drei weiteren Milchproben nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, daß alle Milchproben, die 10^1 - 10^7 KBE von *M. bovis*/ml Milch enthielten, auch in der PCR positiv waren. Außerdem wurde *M. bovis* mittels PCR in 7 von 12 Milchproben nachgewiesen, die erst nach Subkultivierung ein Wachstum von *M. bovis* zeigten.

Die PCR erwies sich somit als eine geeignete Methode zum Nachweis von *M. bovis* in Milch.

7 SUMMARY

ANKE PFLITSCH

Detection of *Mycoplasma bovis* by polymerase chain reaction

M. bovis is a causative agent of mastitis in cows. The *M. bovis*-mastitis is an enzootic disease and characterized by therapy-resistance. To minimize the economic loss an early diagnosis of the disease is absolutely necessary. The symptoms of the *M. bovis*-mastitis are not pathognomonic and the cultural detection of *M. bovis* in milk is time-consuming and laborious. Therefore a method was developed to detect *M. bovis* in milk by PCR.

In the first part of the study the conditions of the PCR were optimized. As optimal proved to be a reaction volume of 50 µl containing 10 mmol/l Tris/HCl (pH 8,8), 50 mmol/l KCl, 3,0 mmol/l MgCl₂, 0,01 % (w/v) gelatine and other stabilizing agents, each 50 µmol/l of the four dNTPs, each 10 pmol of the pMB2-primers, and 2,5 U *Taq* Polymerase. The reaction consisted of 45 cycles with 20 s denaturation at 94 °C, 90 s annealing at 50 °C and 90 s extension at 72 °C.

Specificity was proved by investigating different mycoplasmas and bacteria, size determinations and restriction analysis of PCR-products and hybridizations of the PCR-products with the homologous pMB2-probe. Sensitivity was determined by the investigation of serial dilutions of the DNA and broth cultures of *M. bovis*. The method developed appeared to be specific and rapid allowing the detection of 1 fg DNA or 1 cfu (colony forming unit) of *M. bovis*.

In the second part of the study the PCR was used to detect *M. bovis* in milk. Preliminary experiments with artificial contaminated milk (concentration of milk by lyophilisation or centrifugation) indicated that the inhibiting milkproteins have to be eliminated prior to the PCR. Several methods were tested for the treatment of whole milk, milksediment and milkserum. From these two methods appeared to be suitable for the detection of *M. bovis* in milk:

1. dilution of whole milk with aqua dest. (1:10) followed by PCR, gel electrophoresis and ethidiumbromide staining
 - detection limit: 10⁴ cfu of *M. bovis*/ml milk
2. extraction of the *M. bovis*-DNA from milkserum followed by a first and a second PCR, polyacrylamid gel electrophoresis and silverstaining
 - detection limit: 10² cfu of *M. bovis*/ml milk

The dilution method was used for screening 35 milk samples for *M. bovis*. Eight samples being positive in culture and negative in PCR were tested also by the extraction method. By this *M. bovis* was detected in three samples also. Thus PCR was positive for all milk samples containing 10^1 - 10^7 cfu of *M. bovis*/ml milk. It was positive also for 7 of 12 milk samples showing growth of *M. bovis* after subcultivation only.

The investigations show the suitability of the PCR for the detection of *M. bovis* in milk.